

**Zum cytologischen Nachweis
von fetalem Hämoglobin
mit Amidoschwarz**

Hannelore Schmidt

1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Kinderklinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. K. Betke

Zum cytologischen Nachweis von fetalem Hämoglobin
mit Amidoschwarz

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Hannelore Schmidt

aus
Passau

1974

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München



Berichterstatter	:	Prof. Dr. K. Riegel
Mitberichterstatter	:	Prof. Dr. K. Betke
Dekan	:	Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung : 23. 7. 1974

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

A. Einleitung	Seite 1
B. Originalmethode	4
C. Amidoschwarz-Elutionsmethode	6
D. Fragestellung	7
E. Material, Methoden, Ergebnisse	7
I. Fixationsbedingungen	
1. Fixationsmittel	7
2. Konzentration des zur Fixation verwendeten Äthanols	11
3. Fixationszeit	14
4. Behandlung nach der Fixation	17
II. Elutionsbedingungen	
1. Alkohol in der Elutionslösung	19
2. Konzentration des Äthanols in der Elutionslösung	21
3. Färbemittel	25
4. Amidoschwarzmenge	27
5. Elutionsmittel	29
6. pH-Wert	33
7. Beziehung zwischen Salzsäure- volumen und pH-Wert	37
8. Elutionsdauer	39
III. Anfärbung von Zellkernen	41
IV. Temperaturbedingungen	44
V. Anticoagulantien	
1. Anticoagulans	47
2. Konzentration des Anticoagulans	50

VI. Trocknungszeit der Blutausstriche	Seite 54
VII. Haltbarkeit der Blutausstriche	56
VIII. Aufbewahrung der Lösungen	58
IX. Vergleichsuntersuchungen	
1. Vergleich von AEM und OM	59
2. Vergleich von AEM und quanti- tativer HbF-Bestimmung	61
X. Einfluß hoher Retikulozytenzahlen	63
XI. Klinische Anwendung der AEM	
1. HbF bei Erwachsenen	66
2. HbA bei Neugeborenen	69
3. HbA und HbF bei Neugeborenen	72
4. HbF bei Frauen nach Entbindung	75
F. Zusammenfassung	77
G. Literaturverzeichnis	84
H. Anhang: Tabellen der Einzelwerte Lebenslauf	91

Abkürzungen:

HbA	adultes Hämoglobin
HbF	fetales Hämoglobin
I-Zellen	Intermediärzellen
OM	Originalmethode
AEM	Amidoschwarz-Elutionsmethode
Mischblut	Neugeborenenblut künstlich gemischt mit Er- wachsenenblut gleicher Blutgruppe im Ver- hältnis 1 : 10
NBS	Nilblausulfatlösung
BKB	Brillantkresylblaulösung

A. E I N L E I T U N G

Auf Grund der unterschiedlichen Eigenschaften von adultem (HbA) und fetalem (HbF) Hämoglobin wurden die verschiedensten Methoden entwickelt, mit denen man Fetalhämoglobin nachweisen kann, unter anderem auch die cytologischen Nachweismethoden.

Diese beruhen entweder auf der besseren Löslichkeit des HbA in Säure (saure Elution) oder auf der Darstellung von HbF (oder HbA₂) mit fluoreszierenden Antikörpern; die Fluoreszenzmethoden nach TOMODA (51), HOSOI (29, 30) und HELLER und YAKULIS (24) sind zwar sehr empfindlich, aber für den täglichen Gebrauch doch zu aufwendig. So bieten sich für praktische Belange die wesentlich einfacheren Säureelutionsmethoden an.

1957 gelang es BETKE und KLEIHAUER (8, 37), aus den Erythrozyten eines fixierten Blutaussstriches HbA mit einem sauren Puffergemisch herauszulösen und das in den Zellen verbleibende HbF mit einem Farbstoff sichtbar zu machen. Diese relativ einfache und häufig angewendete Säureelutionsmethode - in der vorliegenden Arbeit wird sie von nun an als "Originalmethode" bezeichnet - wurde noch mehrmals vereinfacht (z. B. von NIERHAUS und BETKE, 44); als letzte Modifikation entwickelten 1971 SANGUANBERMSRI,

KOHNE, KLEIHAUER und BETKE (13, 45) die "Amidoschwarz-Elutionsmethode" - so wird sie weiterhin genannt -.

Der cytologische Nachweis von HbF mit saurer Elution ist auf verschiedenen Gebieten der Medizin (Geburtshilfe, Kinderheilkunde, Innere Medizin) von Bedeutung:

1. Zum Nachweis fetaler Erythrozyten im Blut der Mutter, die während der Schwangerschaft, unter oder nach der Geburt eingeschwemmt wurden - feto-maternale Transfusion - (BETKE und KLEIHAUER 34, 35, 12, COHEN et al. 18, FINN et al. 21, WIMHÖFER et al. 52, ZIEPORSKI et al. 54)

a) Er ermöglicht bei Rhesus-Konstellation (Mutter rh-negativ, Kind Rh-positiv) eine rechtzeitige Verabreichung von Anti-D-IgG an die Mutter zur Sensibilisierungsprophylaxe (HINDEMANN et al. 26, SCHNEIDER 46)

b) Er ermöglicht auch die Erkennung von Blutungsschock bzw. posthämorrhagischer Anämie des Neugeborenen infolge massiver feto-maternaler Transfusion (34, 35).

2. Zum Nachweis fetaler Zellen im Vaginalblut der Schwangeren, z. B. bei Plazenta praevia oder vorzeitiger Lösung der Plazenta:

Hier dient er zur Orientierung über den kindlichen Blutverlust nach außen (34, HICKL 25).

3. Zum Nachweis adulter Zellen im Blut des Neugeborenen:

- a) Bei pathologischer Polyglobulie des Neugeborenen infolge materno-fetaler Transfusion findet man eine über der Norm liegende Anzahl HbA-Zellen (34, 38)
- b) Bei der Differenzierung von prämaturn dystrophen Neugeborenen und echten Frühgeborenen ist dieser Nachweis als zusätzlicher Parameter verwertbar (34, HÖTZEL 31)

4. Zum Nachweis HbF-haltiger Zellen im Blut von Kindern und Erwachsenen mit verschiedenen Blutkrankheiten:

Mehrere Autoren (BETKE und KLEIHAUER 34, 35, 3, 5, 13, CONLEY et al. 20, MARTI und BÜTLER 40, THOMPSON et al. 50, und andere) konnten zeigen, daß bei Thalassämien, bei gewissen hämolytischen Anämien, aplastischen Anämien sowie bei akuten myeloischen Leukämien HbF vermehrt und ungleichmäßig über die Erythrozytenpopulation verteilt ist, während man bei der hereditären Persistenz von HbF (einer klinisch harmlosen Blutfarbstoff-anomalie) eine gleichmäßige Verteilung des HbF über alle Erythrozyten des Blutes findet. Speziell für die Thalassämie empfehlen KLEIHAUER (34), SANSONE e MASSIMO (42) die saure Elution als brauchbaren Screening-Test.

An dieser Stelle seien die Originalmethode und ihre jüngste Modifikation, die Amidoschwarz-Elutionsmethode kurz beschrieben:

B. O R I G I N A L M E T H O D E (OM)
nach BETKE und KLEIHAUER (8, 37, 34, 32)

Material:

1. Frisches Citratblut
2. Fixationsmittel: 80 % Äthylalkohol
3. Elutionsmittel : Zitronensäurephosphatpuffer nach McIlvaine, pH 3,2.
Den gewünschten pH-Wert erhält man durch Mischen der beiden Stammlösungen A und B, die getrennt aufbewahrt werden.
Lösung A: $0,2 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$.
Lösung B: $0,1 \text{ M Zitronensäure}$, DAB 6.
Mischungsverhältnis für pH 3,2:
24,7 ml Lösung A, 75,3 ml Lösung B.
Puffergemisch vor Verwendung entgasen durch Erwärmen auf 70 bis 80°C oder durch 15-minütiges Vorwärmen im Wasserbad bei 37°C .
4. Färbemittel: Hämatoxilin sauer nach Ehrlich.
 0.1% -ige wässrige Erythrosinlösung.

Methode:

Dünne, etwa 40 Minuten luftgetrocknete Blutausstriche werden 5 Minuten in 80 % Äthanol fixiert, anschließend unter fließendem Wasser abgespült und luftgetrocknet. Die Ausstriche werden dann senkrecht in ein Becherglas mit dem Puffer gestellt und 3 - 5 Minuten darin belassen. Zur Durchmischung des Puffers und des herausgelösten Hämoglobins werden die Ausstriche nach 1 und 2 Minuten einmal kurz herausgehoben und wieder zurückgestellt. Nach der Elution werden die Präparate wieder unter fließendem Wasser abgespült, dann 3 Minuten in Hämatoxin und nach erneuter Wässerung 3 Minuten in Erythrosin gefärbt.

Ergebnis:

HbA wird aus den Zellen herausgelöst, HbF geht nicht in Lösung und färbt sich mit Erythrosin je nach Konzentration unterschiedlich rot an: die HbF-Zellen kräftig rot, die Intermediärzellen (I-Zellen), die gleichzeitig HbF und HbA enthalten rosa bis schwach rot; die HbA-Zellen stellen sich als leere, konturierte Schatten dar.

Die Beurteilung und Auszählung der Erythrozyten erfolgt bei ca. 450-facher Vergrößerung im Lichtmikroskop. Zur leichteren Zählung engt man das Gesichtsfeld durch runde oder viereckige ausgestanzte Papierblenden ein und unterteilt es zusätzlich noch, z. B. durch ein Okulargitter.

C. A M I D O S C H W A R Z - E L U T I O N S M E T H O D E
(AEM)

nach SANGUANSEMSRI, KOHNE, KLEIHAUER und BETKE (45, 13)

Material:

1. Fixationsmittel: 80 %iger Äthylalkohol

2. Elutions- und

Färbemittel : 100 mg Amidoschwarz-10B
100 ml 80 %iger Äthylalkohol
1 N Salzsäure (HCl) zur Einstellung im pH-Meter auf pH 2.

Methode:

Dünne, luftgetrocknete Blutaussstriche werden 2 Minuten in 80 % Äthanol fixiert, hierauf 2 Minuten in die hergestellte Elutionslösung gesteckt und zum Schluß ca. 15 Sekunden mit Leitungswasser gespült. Nach Lufttrocknung werden die Präparate unter dem Lichtmikroskop betrachtet.

Ergebnis:

Die HbF-Zellen stellen sich dunkelblau dar, die I-Zellen hellblau; von den leeren HbA-Zellen ist nur die Wand als konturierter Schatten sichtbar.

D. F R A G E S T E L L U N G

Es galt diejenigen Bedingungen herauszufinden, unter denen mit der Amidoschwarz-Elutionsmethode die besten Ergebnisse erzielt werden können. Zu diesem Zweck wurde jeder Teilschritt der AEM systematisch abgewandelt, wobei die übrigen Bedingungen jeweils konstant blieben.

E. M A T E R I A L, M E T H O D E N, E R G E B N I S S E

I. F I X A T I O N S B E D I N G U N G E N

I.1 Fixationsmittel (Abb. 1 - 6)

Versuchsbeschreibung:

Als Fixationsmittel wurden 80 % Methanol, 80 % Äthanol, 80 % Propanol, 80 % Butanol, 5 % Formalinlösung, 80 % Aceton und 90 % Aceton verwendet. Die gewünschte Konzentration wurde jeweils durch Verdünnen von absolutem Alkohol mit Aqua dest. hergestellt; Formalin war in 5 %-iger Konzentration vorhanden.

Fixationszeit: 2 min. Weitere Behandlung der Präparate wie auf S. 6 angegeben.

Jedes Fixationsmittel wurde mit 2 Ausstrichen von

Mischblut (Neugeborenenblut : Erwachsenenblut gleicher Blutgruppe = 1 : 10) und 1 Ausstrich von Erwachsenenblut getestet.

Die Beurteilung der Zellen erfolgte nach morphologischen Gesichtspunkten im Mikroskop bei 320-facher Vergrößerung.

Ergebnis:

80 % Methanol	Zellwände der HbA-Zellen nicht ganz scharf begrenzt. HbF- und I-Zellen deutlich erkennbar (Abb. 1).
80 % Äthanol	Zellgrenzen der HbA-Zellen i. a. glatt, teilweise etwas unscharf; HbF-Zellen homogen gefärbt. HbA-, I- und HbF-Zellen sehr gut zu unterscheiden (Abb. 2).
80 % Propanol	Zellgrenzen der HbA-Zellen noch erkennbar. HbF-Zellen heller gefärbt als bei Methanol- und Äthanolfixation, Anfärbung ungleichmäßig. I-Zellen fein granuliert. Unterscheidung von HbA- und HbF-Zellen noch möglich, I-Zellen vermehrt (Abb. 3).
80 % Butanol	HbA-Zellen nicht ganz eluiert, Zellgrenzen nicht glatt. HbF-Zellen schwach gefärbt mit grober dunkler Granulierung. Grobe Unterscheidung noch möglich, jedoch HbF- und I-Zellen kaum mehr zu unterscheiden (Abb. 4).

5 % Formalin- lösung	HbA- und HbF-Zellen vollständig eluiert. Alle Zellen nur noch als schwache Schatten zu ahnen. Unterscheidung von HbA-, I- und HbF-Zellen nicht möglich (Abb. 5).
80 % Aceton	HbA-Zellen nicht vollständig eluiert, schwach angefärbt, Zellwände z. T. auflöst. HbF-Zellen vergrößert, deformiert, jedoch deutlich dunkel angefärbt (Abb. 6).
90 % Aceton	Alle Zellen vollständig eluiert und zerstört.

Zusammenfassung:

Als bestes Fixationsmittel erwies sich Äthanol. Eine gute Unterscheidung von HbA-, I- und HbF-Zellen ermöglichte auch Methanol. Mit Propanol, Butanol und 80 % Aceton war eine eindeutige Unterscheidung der einzelnen Zellarten nicht mehr möglich, Formalin und 90 % Aceton erwiesen sich als völlig unbrauchbar.

Für alle weiteren Versuche wurde Äthanol zur Fixation verwendet.

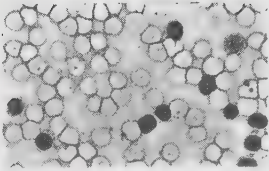


Abb. 1
80 % Methanol

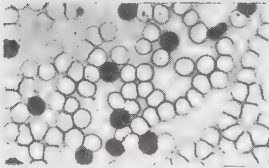
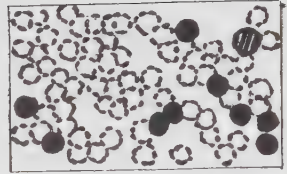


Abb. 2
80 % Äthanol

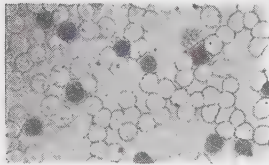
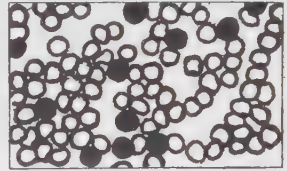


Abb. 3
80 % Propanol

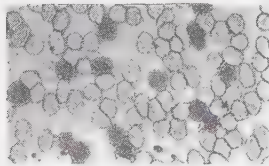
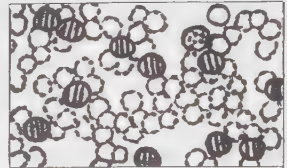


Abb. 4
80 % Butanol



Abb. 5
5 % Formalinlös.

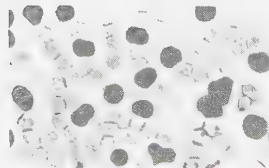
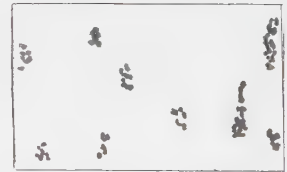
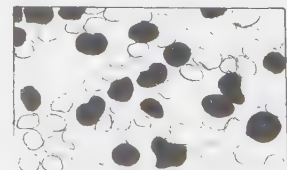


Abb. 6
80 % Aceton



I.2 Konzentration des zur Fixation verwendeten Äthanol

(Abb. 7 - 10)

Versuchsbeschreibung:

Die Konzentration des zur Fixation verwendeten Äthanol wurde stufenweise durch Verdünnung mit Aqua dest. von 100 % bis auf 60 % gesenkt.

Die Fixationszeit betrug jeweils 2 min., die Elution der Präparate erfolgte wie auf S. 6 angegeben.

Jede Konzentration wurde mit 2 Mischblutausstrichen und 1 Erwachsenenblutausstrich getestet.

Es wurden die I- und HbF-Zellen pro 1000 Erythrozyten bei 320-facher Vergrößerung im Mikroskop ausgezählt und jeweils der Mittelwert aus 2 Mischblutausstrichen gebildet. Außerdem Beurteilung der Morphologie bei 600-facher Vergrößerung (Ölimmersion) im Mikroskop.

Ergebnis: Tabelle 1

Äthanolkonzentration	I-Zellen pro 1000 Ery	HbF-Zellen pro 1000 Ery
100 %	0	0
90 %	0	0
85 %	3	103
80 %	2	123

79 %	3	105
78 %	4	119
77 %	3	101
76 %	3	112
75 %	2	109
70 %	95	0
60 %	-	-

Zusammenfassung:

Bei Konzentrationen über 85 % waren alle Zellen vollständig eluiert, so daß keine I- oder HbF-Zellen zu finden waren (Abb. 7). In dem Bereich von 85 - 75 % waren HbA-, I- und HbF-Zellen deutlich unterscheidbar. Jedoch nahm in den oberen Konzentrationen von 78 - 85 % die Zerstörung der Zellmembranen der HbA-Zellen zu, wobei aber die HbF-Zellen homogen dunkel gefärbt waren (Abb. 8), während bei den unteren Konzentrationen von 77 - 70 % die HbA-Zellen zunehmend besser erhalten blieben und dafür die HbF-Zellen immer mehr Vakuolen aufwiesen, so daß man bei 70 % die sehr stark vakuolisierten und insgesamt helleren HbF-Zellen leicht für I-Zellen halten konnte (Abb. 10). Bei Konzentrationen unter 70 % waren alle Zellen eluiert und zerstört.

Am geeignetsten erwies sich zur Fixation eine Äthanolkonzentration von 77 - 78 % (Abb. 9). Für alle weiteren Versuche wurde deshalb zur Fixation 78 % Äthanol verwendet.

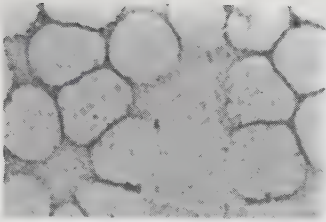


Abb.7 90 % Äthanol

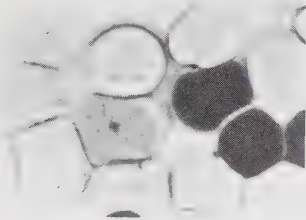
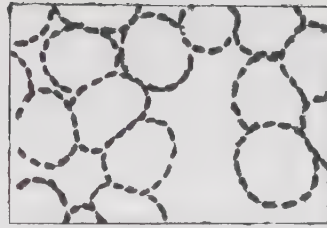


Abb.8 85 % Äthanol

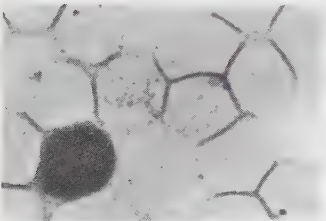
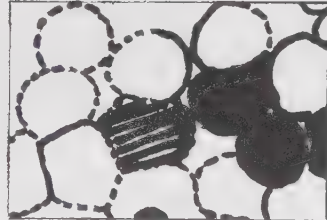


Abb.9 77 % Äthanol

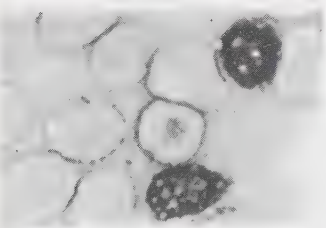
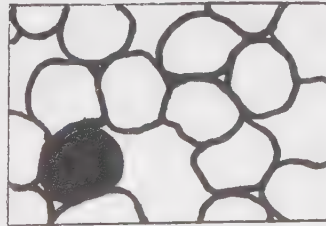


Abb.10 70 % Äthanol



I.3 Fixationszeit (Abb. 11 - 14)

Versuchsbeschreibung:

22 Mischblutausstriche und 11 Erwachsenenblutausstriche wurden in die Fixationslösung (78 % Äthanol) gestellt. Nach 1 sek., 30 sek., 1 min., 60 min. wurden jeweils 3 Ausstriche (2 Mischblut- und 1 Erwachsenenblutausstrich) wieder herausgenommen und anschließend 2 min. eluiert, wie auf S. 6 angegeben. 3 Ausstriche wurden ohne Fixation sofort in die Elutionslösung gesteckt.

Die gefärbten Präparate wurden unter dem Lichtmikroskop bei 320-facher Vergrößerung betrachtet und nach Morphologie und Färbung der Erythrozyten beurteilt.

Ergebnis:

Fixationszeit	Beurteilung
-----	HbA-, I- und HbF-Zellen vollständig eluiert. Zellgrenzen unscharf. Morphologisch unauffällig.
1 sek.	HbF- ebenso wie I-Zellen hellblau angefärbt, HbA-Zellen eluiert, Zellgrenzen unscharf.
30 sek.	Wie bei 1 sek., HbF-Zellen jedoch

etwas kräftiger angefärbt.

1 min.	HbF-Zellen noch dunkler blau gefärbt als bei 30 sek. Auch Zellgrenzen schärfer.
2 min.	HbF-Zellen dunkelblau, I-Zellen hellblau, HbA-Zellen vollständig eluiert, Zellgrenzen scharf; Zellarten deutlich voneinander zu unterscheiden.
5 min.	Wie bei 2 min.
10 min.	HbA-Zellen mit leicht bläulichem Schimmer, also nicht mehr ganz eluiert; Unterscheidung von HbA-, I- und HbF-Zellen aber noch sehr gut möglich.
20 min.	Wie bei 10 min.
30 min.	"
40 min.	"
50 min.	"
60 min.	"

Zusammenfassung:

Die optimale Fixationszeit beträgt 2 - 5 min. Auch bei einer Fixationszeit von 10 - 60 min. kann man die einzelnen Zellarten noch gut unterscheiden. Weniger als 2 min. sollte die Fixationszeit nicht betragen, da hierbei die HbF-Zellen noch zu schwach angefärbt sind und demnach mit I-Zellen verwechselt werden können.

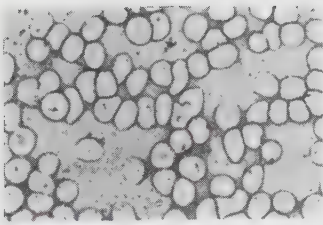


Abb.11 ohne Fixation

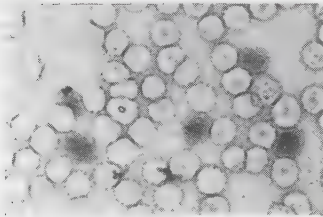
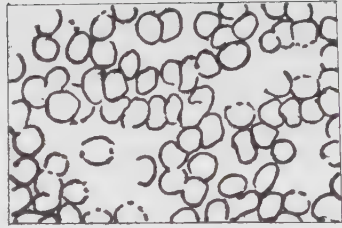


Abb.12 Fixationszeit
1 sek.

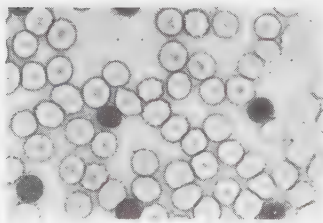
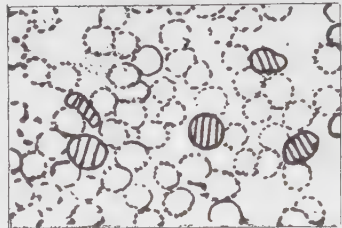


Abb.13 Fixationszeit
2 min.

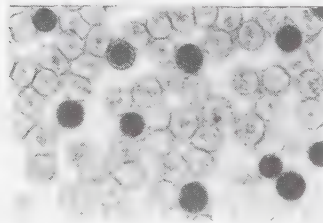
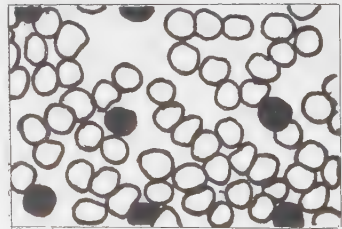


Abb.14 Fixationszeit
60 min.



I.4 Behandlung nach der Fixation

Versuchsbeschreibung:

24 Blutausstriche wurden 2 min. in 78 % Äthanol fixiert. Danach wurden jeweils 3 Ausstriche (2 Mischblut- und 1 Erwachsenenblutausstrich) entweder nach Abspülen mit Wasser oder nach Lufttrocknung oder ohne Zwischenbehandlung eluiert, wie auf S. 6 angegeben.

Beurteilung der Präparate nach morphologischen Gesichtspunkten bei 320-facher Vergrößerung im Lichtmikroskop.

Ergebnis:

Behandlung nach Fixation

Beurteilung

- 1) Kurzes Abspülen mit Leitungswasser

Viele Luftbläschen. Zellen teils zerstört, teils ungleichmäßig angefärbt.

- 2) Wässern + 10 min. Lufttrocknen

Luftbläschen. HbF-Zellen viele Vakuolen.

- 3) Wässern + 20 min. Lufttrocknen

Luftbläschen. HbA-Zellen nicht voll eluiert.

- 4) Wässern + 60 min. Lufttrocknen

Luftbläschen. Zellen ungleichmäßig angefärbt.

- 5) 10 min. Lufttrocknen ohne Wässern

Luftbläschen. HbA-Zellgrenzen undeutlich.

- | | |
|--------------------------------------|---|
| 6) 20 min. Lufttrocknen ohne Wässern | HbA-, I- und HbF-Zellen sehr gut zu unterscheiden. Morphologie gut. |
| 7) 60 min. Lufttrocknen ohne Wässern | " |
| 8) Elution sofort nach Fixation | " |

Zusammenfassung:

Obwohl nach jeder der getesteten Behandlungsweisen HbF-Zellen von den übrigen Zellen unterschieden werden konnten, ist es doch nicht ratsam, die Ausstriche nach der Fixation zu wässern (mit oder ohne Lufttrocknung) oder ohne Wässern weniger als 20 min. zu trocknen. Denn diese Präparate wiesen danach jeweils viele Luftbläschen und eine ungleichmäßige Anfärbung der Zellen auf.

Eine Lufttrocknungszeit von 20 - 60 min. nach der Fixation dagegen brachte gute Ergebnisse, als ebensogut erwies sich aber auch das schnellste Verfahren: Fixation und - ohne Zwischenbehandlung - sofort Elution.

II. ELUTIONSBEDINGUNGEN

II.1 Alkohol in der Elutionslösung

Versuchsbeschreibung:

5 Mischblutausstriche wurden 2 min. in 78 Äthanol fixiert. Die anschließende Elution (2 min.) erfolgte für jeden Ausstrich in einer eigenen Elutionslösung. Jede dieser 5 Lösungen war mit einem anderen Alkohol hergestellt worden nach dem auf S. 6 angegebenen Rezept:

100 mg Amidoschwarz

100 ml des zu prüfenden Alkohols

(Methanol, Propanol.....)

1N HCl bis pH 2 (Einstellung im pH-Meter)

Die eluierten Ausstriche wurden wie üblich mit Leitungswasser abgespült und nach Lufttrocknung bei 320-facher Vergrößerung im Lichtmikroskop nach ihrer Morphologie beurteilt.

Ergebnis:

Alkohol	Beurteilung
80 % Methanol	HbF-Zellen dunkelblau gefärbt, HbA-Zellen teils nicht vollständig eluiert, Zellgrenzen unscharf. I-Zellen vermehrt.

80 % Äthanol	HbA-Zellen vollständig eluiert, Zellgrenzen scharf. I-Zellen hellblau, HbF-Zellen dunkelblau. Die 3 Zellarten deutlich voneinander unterscheidbar.
80 % Propanol	Ähnlich wie bei Äthanol.
80 % Butanol	HbF-Zellen heller blau gefärbt als mit Äthanol; deshalb nicht immer eindeutig von I-Zellen zu unterscheiden. HbA-Zellen vollständig eluiert.
80 % Aceton	HbA-Zellen nicht vollständig eluiert, Zellgrenzen unscharf. Verwechslung mit I-Zellen möglich. HbF-Zellen durch dunkelblaue Farbe jedoch erkennbar.

Zusammenfassung:

Die besten Ergebnisse brachte - wie bei der Fixation, so auch in der Elutionslösung - Äthanol. Deshalb wurden auch die weiteren Versuche mit Äthanol ausgeführt. Ebenfalls gut brauchbar zeigte sich 80 % Propanol.

Als ungünstig erwiesen sich Methanol, Butanol und Aceton.

II.2 Konzentration des Äthanols in der Elutionslösung

(Abb. 15 - 20)

Versuchsbeschreibung:

7 verschiedene Elutionslösungen wurden nach dem auf S. 6 angegebenen Rezept hergestellt. Statt der Äthanolkonzentration von 80 % wurde jeweils eine andere Konzentration (von 90 - 60 %) verwendet, die durch Verdünnung des Äthanols mit Aqua dest. hergestellt wurde. Pro Test wurden 3 Ausstriche (1 Erwachsenen- und 2 Mischblutausstriche) 2 min. in 78 % Äthanol fixiert und 2 min. in der zu prüfenden Elutionslösung eluiert. Nach Wässern und Trocknen Betrachtung im Lichtmikroskop bei 600-facher Vergrößerung (Ölimmersion).

Ergebnis:

Äthanolkonzentration

Beurteilung

90 %

Keine einzige Zelle eluiert. Alle Zellen verkleinert, deformiert
(Abb. 15)

85 %

HbA-Zellen bereits eluiert, jedoch I-Zellen noch vermehrt (vgl. Erwachsenenblut Abb. 17). Zellgrenzen

	der HbA-Zellen teils unscharf. HbF-Zellen deutlich dunkel angefärbt (Abb. 16).
80 %	Gute Unterscheidung von HbA-, I- und HbF-Zellen möglich. I-Zellen nicht mehr vermehrt. Zellgrenzen aller Zellen scharf, morphologisch unauffällig.
75 %	Wie bei 80 %.
70 %	Wie bei 80 % (Abb. 18).
60 %	HbA-Zellen zerstört, HbF-Zellen noch deutlich erkennbar (Abb. 19).
Aqua dest.	Alle Zellen eluiert und zerstört (Abb. 20).

Zusammenfassung:

Als ungeeignet erwiesen sich Konzentrationen von mehr als 80 %, da hier keine zuverlässige Elution der HbA-Zellen mehr stattfand, und von weniger als 70 %, da hier die Zellstrukturen zerstört waren.

Die Äthanolkonzentrationen in dem Bereich von 70 - 80 % brachten die besten Ergebnisse. Für die übrigen Versuche wurden deshalb in der Elutionslösung Äthanolkonzentrationen in diesem Bereich verwendet.

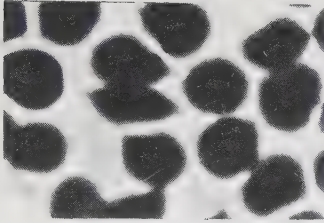


Abb.15 90 % Äthanol

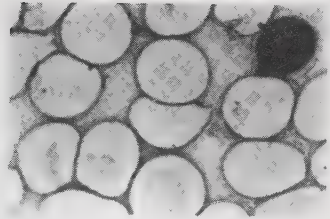


Abb.18 70 % Äthanol

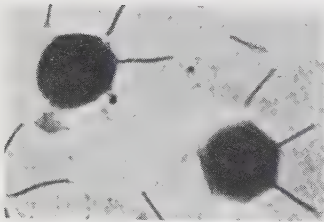


Abb.16 85 % Äthanol

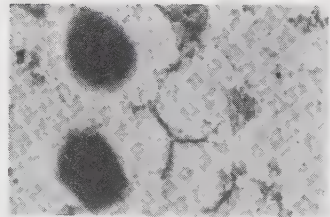


Abb.19 60 % Äthanol

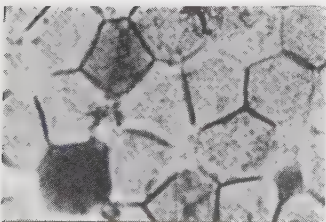


Abb.17 85 % Äthanol
Erwachsenenblut

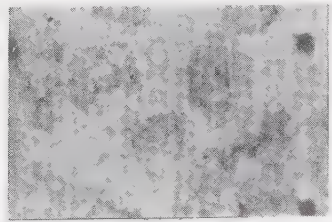


Abb.20 Aqua dest.

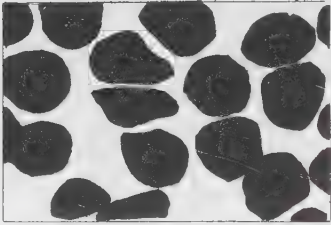


Abb.15 90 % Äthanol

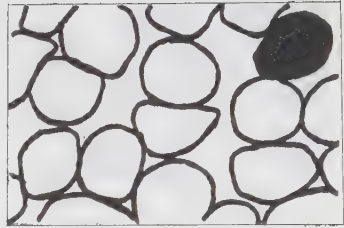


Abb.18 70 % Äthanol



Abb.16 85 % Äthanol

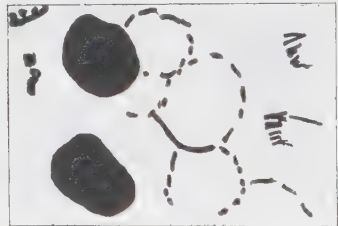


Abb.19 60 % Äthanol

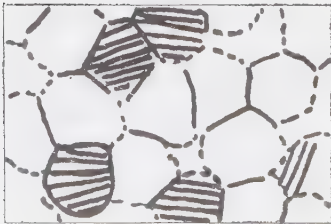


Abb.17 85 % Äthanol
Erwachsenenblut

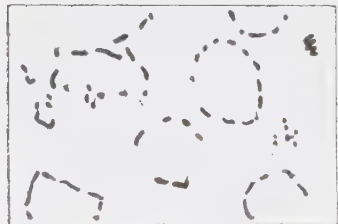


Abb.20 Aqua dest.

Schematische Darstellungen zu den Mikrofotografien

II.3 Färbemittel

Versuchsbeschreibung:

Von 5 Farbstoffen wurden jeweils 100 mg mit einer Waage abgewogen. Dann wurden 5 Elutionslösungen nach dem auf S. 6 angegebenen Verfahren zubereitet, von denen jede statt Amidoschwarz einen der 5 Farbstoffe enthielt.

Nun wurden 15 Ausstriche wie üblich 2 min. lang in 78 % Äthanol fixiert und anschließend jeweils 3 Ausstriche (1 Erwachsenen- und 2 Mischblutausstriche) in einer der 5 Elutionslösungen gefärbt. Zum Schluß Wässerung, Trocknung und Begutachtung im Lichtmikroskop bei 320-facher Vergrößerung.

Ergebnis:

Farbstoff	Beurteilung
Amidoschwarz-10B	HbF-Zellen dunkelblau, I-Zellen hellblau, HbA-Zellen ungefärbt. Unterscheidung sehr gut möglich. Auch Granulo- und Lymphozytenkerne dunkelblau, Zytoplasma dieser Zellen hellblau.

Erythrosin	HbF-Zellen rot, I-Zellen rosa, HbA-Zellen ungefärbt. Sehr gut voneinander zu unterscheiden. Kerne der Granulo- und Lymphozyten ebenfalls rot gefärbt, Zytoplasma rosa.
Methylenblau B	HbF- und I-Zellen nur ganz schwach hellblau und ungleichmäßig gefärbt. HbA-Zellen ungefärbt.
Echtblausalz B	Wie bei Methylenblau B.
Sudanschwarz B	Wie bei Methylenblau B.

Zusammenfassung:

Eine deutliche farbliche Unterscheidung von HbF-, I- und HbA-Zellen ermöglichte Amidoschwarz. Als brauchbar erwies sich auch Erythrosin, während Methylenblau, Echtblausalz und Sudanschwarz die HbF-Zellen kaum anfärbten und deshalb nicht geeignet erschienen.

Für die weiteren Versuche wurde wie bisher Amidoschwarz verwendet.

II.4 Amidoschwarzmenge

Versuchsbeschreibung:

Von dem Farbstoff Amidoschwarz-10B wurden 5 verschiedenen große Mengen (300 - 10 mg) mit einer Waage abgewogen und damit 5 Elutionslösungen nach dem auf S. 6 angegebenen Rezept hergestellt.

Nun wurden 15 Ausstriche 2 min. in 78 % Äthanol fixiert, dann jeweils 3 der Ausstriche (1 Erwachsenen- und 2 Mischblutausstriche) in einer der 5 Elutionslösungen 2 min. eluiert, mit Wasser abgespült, luftgetrocknet und im Mikroskop bei 320-facher Vergrößerung betrachtet.

Ergebnis:

Amidoschwarz-
menge

300 mg

Beurteilung

HbF- (dunkelblau), I- (hellblau) und HbA-Zellen (ungefärbt) deutlich unterscheidbar. Amidoschwarz- jedoch im Alkohol nicht ganz gelöst: schwarzblauer Niederschlag in der Elutionslösung. Auf den Objektträgern Häufchen von Amido-

	schwarz klebend.
200 mg	Sehr gute Anfärbung von HbF- und I-Zellen, gute Unterscheidung möglich. Auch hier - etwas weniger als bei 300 mg - Amidoschwarzgranula über das Präparat verstreut.
100 mg	Wie bei 200 mg, aber nur noch wenige Amidoschwarzgranula zu sehen.
50 mg	Unterscheidung der einzelnen Zellarten noch gut möglich, jedoch HbF-Zellen etwas heller blau gefärbt. Keine Amidoschwarzgranula mehr zu sehen.
10 mg	Unterscheidung von HbF- und I-Zellen nicht mehr eindeutig möglich, da HbF-Zellen nur noch hellblau gefärbt.

Zusammenfassung:

Als günstig erwies sich eine Amidoschwarzmenge von 50 - 200 mg auf 100 ml Äthanol. Eine geringere Menge als 50 mg reichte offensichtlich nicht aus, die HbF-Zellen genügend stark anzufärben, und eine größere Menge als 200 mg erwies sich als überflüssig.

Für die weiteren Versuche wurden deshalb wie bisher 100 mg Amidoschwarz in 100 ml Elutionslösung aufgelöst.

II.5 Elutionsmittel (Abb. 21 - 25)

Versuchsbeschreibung:

Es wurden 6 verschiedene Elutionslösungen hergestellt wie auf S. 6 angegeben, jedoch wurde der pH-Wert statt mit 1N Salzsäure jeweils mit einer anderen Säure im pH-meter auf pH 2,0 eingestellt.

Nun wurden 18 Blutaussstrich 2 min. in 78 % Äthanol fixiert, dann je 3 Ausstriche (1 Erwachsenen- und 2 Mischblutaussstriche) in eine der 6 Elutionslösungen gestellt, nach 2 min. herausgenommen, gewässert und im Mikroskop bei 320-facher Vergrößerung begutachtet.

Ergebnis:

Elutionsmittel	Beurteilung
1N Salzsäure	HbA-, I- und HbF-Zellen sehr gut voneinander zu unterscheiden. Morphologisch unauffällig (Abb. 21).
Milchsäure reinst 90 %	HbA-Zellen offensichtlich zerstört, da nicht mehr erkennbar. HbF- und I-Zellen schwach und ungleichmäßig angefärbt. Unterscheidung

Essigsäure 96 %
(Eisessig)

1N Schwefelsäure

2M Citronensäure

Ameisensäure
98 - 100 %

nicht möglich.

Wie bei Milchsäure (Abb. 22).

Alle Zellen hellblau gefärbt, deshalb Unterscheidung von HbA-I- und HbF-Zellen nicht möglich. Alle Zellen verkleinert und deformiert (Abb. 23).

Auf großen Stellen des Objektträgers Amidoschwarzgranula fest haftend. An unbedeckten Stellen zu erkennen: HbA-Zellen als schwach bläuliche Schatten, kaum wahrnehmbar; HbF- und I-Zellen ungleichmäßig blau gefärbt, jedoch gut zu sehen (Abb. 24).

Viele kleine Amidoschwarzkörnchen diffus über das ganze Präparat verstreut, wie bei Citronensäure fest haftend trotz Abspülens mit Wasser. HbA-Zellen unscharf, z. T. ganz zerstört; HbF-Zellen deutlich dunkelblau, I-Zellen hellblau, beide morphologisch unauffällig und gut zu unterscheiden (Abb. 25).

Zusammenfassung:

Durch Milchsäure, Essigsäure, Schwefelsäure und Citronensäure wurden alle Zellen mehr oder weniger so verändert, daß sie nicht mehr zu unterscheiden waren. Ameisensäure zerstörte nur die HbA-Zellen, während HbF- und I-Zellen gut erhalten blieben. Salzsäure erhielt jedoch alle Zellen in ihrer Struktur und ermöglichte die beste Unterscheidung von HbA-, I- und HbF-Zellen.

Deshalb wurde auch weiterhin 1N Salzsäure in der Elutionslösung verwendet.

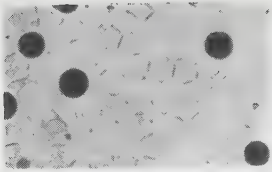


Abb. 21
Salzsäure

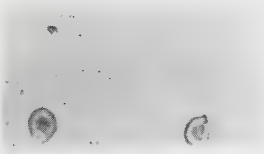
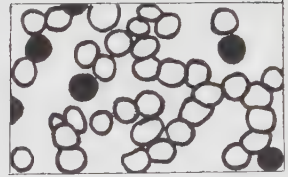


Abb. 22
Essigsäure

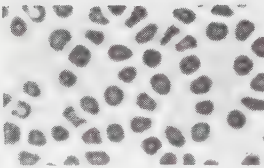


Abb. 23
Schwefelsäure

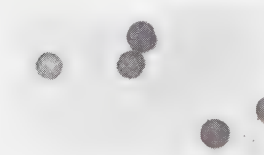


Abb. 24
Citronensäure

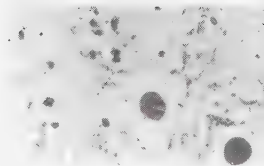
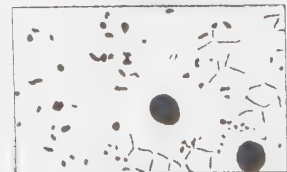


Abb. 25
Ameisensäure



II.6 pH-Wert (Abb. 26 - 28)

Versuchsbeschreibung:

36 Mischblut- und 18 Erwachsenenblutausstriche wurden angefertigt. Dann wurde eine Elutionslösung nach dem auf S. 6 angegebenen Rezept hergestellt, jedoch im pH-Meter mit 1N HCl auf einen pH-Wert von 3,45 eingestellt. 3 Blutausstriche (2 Misch- und 1 Erwachsenenblutausstrich) wurden nun 2 min. in 78 % Äthanol fixiert, dann 2 min. in dieser Elutionslösung eluiert, anschließend gewässert und luftgetrocknet. Nach und nach wurde nun der pH-Wert durch Zugabe von 1N HCl um jeweils 0,5 gesenkt und jede dieser Lösungen mit 3 Präparaten getestet.

Die Senkung um pH 0,5 diente zur groben Orientierung. Um genauere Angaben machen zu können, wurde der ganze Vorgang mit einer neuen Elutionslösung wiederholt, wobei der von pH 2,4 ausgehend um jeweils 0,2 gesenkt wurde. Die gefärbten Präparate wurden wie üblich im Mikroskop bei 320-facher Vergrößerung begutachtet.

Ergebnis:

pH-Senkung in großen Schritten

pH-Wert	Beurteilung
3,45	Alle Zellen dunkelblau, also auch HbA-Zellen nicht eluiert.
3,0	Wie bei pH 3,5.
2,5	Wie bei pH 3,5 (Abb. 26).
2,0	HbA-Zellen vollständig eluiert, HbF-Zellen dunkelblau, I-Zellen hellblau: Unterscheidung sehr gut möglich.
1,5	HbF-Zellen heller als bei pH 2,0. Unterscheidung aber noch gut möglich.
1,0	HbF-Zellen noch etwas heller, HbA-Zellen nicht mehr ganz vollständig eluiert.
0,5	HbA-Zellen hellblau, zu verwechseln mit I-Zellen. HbF-Zellen aber an ihrer dunklen Farbe noch zu erkennen.

pH-Senkung in kleinen Schritten

2,4	HbA-Zellen nicht vollständig eluiert, aber HbA-, I- und HbF-Zellen bereits gut zu unterscheiden.
2,2	HbA-Zellen voll eluiert, Unterscheidung der 3 Zellarten sehr gut möglich.
2,0	Wie bei pH 2,2.
1,8	Wie bei pH 2,2.

1,6	Wie bei pH 2,2 (Abb. 27).
1,4	HbF-Zellen etwas heller als bei pH 2,2 - 1,6. Unterscheidung aber noch möglich.
1,2	HbF-Zellen noch etwas heller. HbA-Zellen nicht mehr voll eluiert. Unterscheidung immer noch möglich.
1,0	Wie bei pH 1,2.
0,8	Wie bei pH 1,2.
0,6	HbA-Zellen hellblau wie I-Zellen. HbF-Zellen dunkelblau.
0,4	Wie bei pH 0,6 (Abb. 28).

Zusammenfassung:

Bei pH-Werten über 2,4 waren alle Zellen dunkelblau angefärbt; HbA war demnach nicht eluiert worden. Bei pH-Werten unter 1,4 nahm mit sinkendem pH offensichtlich auch die Elution von HbA ab, da sich die HbA-Zellen zunehmend stärker blau färbten. In dem pH-Bereich von 2,2 - 1,6 erschienen die HbA-Zellen vollständig eluiert, die I-Zellen hellblau und die HbF-Zellen dunkelblau und konnten somit am besten voneinander unterschieden werden.

Die weiteren Versuche wurden bei pH-Werten von 2,0 - 1,8 durchgeführt.

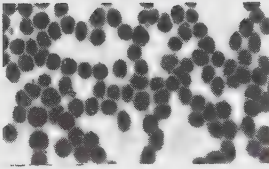


Abb. 26
pH 2,5

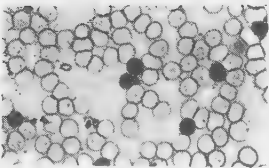


Abb. 27
pH 1,6

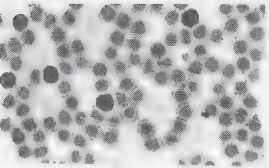
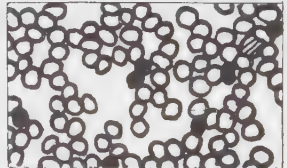
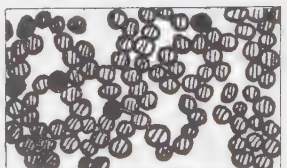


Abb. 28
pH 0,4



II.7 Beziehung zwischen Salzsäurevolumen und pH-Wert

Versuchsbeschreibung:

Zu einer Lösung aus 100 mg Amidoschwarz und 100 ml 80 % Äthanol wurde mit einer graduierten Glaspipette 1N HCl zugegeben; die Lösung wurde dabei automatisch mit einem Magnetrührer vermischt und der pH-Wert am vorher geeichten pH-Meter abgelesen. Das HCl-Volumen, das zum Erreichen des jeweiligen pH-Wertes (von 2,4 - 1,4) nötig war, wurde an der Graduierung der Pipette abgelesen. Die Messungen wurden bei einer Zimmertemperatur von 21 °C durchgeführt.

Ergebnis: Tabelle 2

pH-Wert	1N HCl
2,4	1,2 ml
2,2	2,0 ml
2,0	3,25 ml
1,8	5,2 ml
1,6	7,98 ml
1,4	12,73 ml

Zusammenfassung:

Bei Zugabe von 2,0 - ca. 8,0 ml 1N HCl zu 100 ml Elutionslösung wurden pH-Werte von 2,2 - 1,6 erreicht. Will man die Lösung ohne pH-Kontrolle herstellen, so sollte man 4 ml HCl zugeben, weil damit sicher die optimalen pH-Grenzen (2,0 - 1,8) erreicht werden und etwaige temperaturabhängige pH-Schwankungen unberücksichtigt bleiben können.

Für die weiteren Versuche wurde der pH-Wert wie bisher mit dem pH-Meter auf pH 2,0 eingestellt.

II.8 Elutionsdauer

Versuchsbeschreibung:

Es wurden 16 Mischblut- und 8 Erwachsenenblutausstriche angefertigt, nach Lufttrocknung 2 min. in 78 % Äthanol fixiert, anschließend in eine nach S. 6 angefertigte Elutionslösung gesteckt. Nach 1 sek., 30 sek., 1 min., 60 min wurden je 3 Ausstriche (2 Mischblut- und 1 Erwachsenenblutausstrich) herausgenommen, mit Wasser abgespült und luftgetrocknet. Unter dem Lichtmikroskop wurden bei 320-facher Vergrößerung die I- und HbF-Zellen pro 1000 Erythrozyten in den Mischblutausstrichen ausgezählt. Für die Tabelle wurde jeweils der Mittelwert aus 2 Präparaten genommen.

Ergebnis: Tabelle 3

Elutionsdauer	I-Zellen pro 1000 Erys	HbF-Zellen pro 1000 Erys
1 sek	83	--
30 sek	13	50
1 min	21	50
2 min	16	64
5 min	16	72
10 min	16	70

30 min	14	70
60 min	27	68

Zusammenfassung:

Bei Elutions- (und zugleich Färbe-)zeiten von 1 sek - 1 min waren zwar die HbA-Zellen bereits eluiert, die HbF-Zellen aber noch nicht genügend dunkelblau angefärbt, so daß sie z. T. von den I-Zellen nicht zu unterscheiden waren.

Am konstantesten waren die Zählergebnisse bei Elutionszeiten von 2 - 30 min, wobei ab 5 min zwar die HbA-Zellen zunehmend einen schwach bläulichen Schimmer zeigten, aber noch gut von I-Zellen unterschieden werden konnten. Bei einer Elutionsdauer von mehr als 30 min nahmen jedoch die I-Zellen zu.

Für die weiteren Versuche wurde wie bisher eine Elutionszeit von 2 min beibehalten.

III. ANFÄRBUNG VON ZELLKERNEN

Es wurde beobachtet, daß sich mit der AEM nicht nur HbF-Zellen, sondern auch die Kerne von Leuko- und Lymphozyten dunkelblau anfärbten. Diese kernhaltigen Zellen waren zwar in den meisten Fällen durch Größe, Kernform und hellen Zytoplasmasaum eindeutig zu identifizieren, einzelne kleine Lymphozyten jedoch, etwa in der Größe eines Erythrozyten, mit großem Kern und nur geringem Zytoplasmaanteil, waren manchmal kaum von einer HbF-Zelle zu unterscheiden. Deshalb sollte eine Kernfärbung gefunden werden, die eine farbliche Unterscheidung von kernhaltigen und HbF-Zellen ermöglicht.

Versuchsbeschreibung:

Von dem Blut eines Säuglings mit relativer Lymphozytose wurden 10 Ausstriche angefertigt. 2 Ausstriche wurden nach der OM nach BETKE und KLEIHAUER gefärbt, die eine Kernfärbung mit saurem Hämatoxinilin nach Ehrlich enthält (s. S. 4). Die übrigen 8 Ausstriche wurden nach der AEM gefärbt (s. S. 6, jedoch Fixation in 78 % Äthanol), davon 2 Ausstriche nach dem Abspülen mit Wasser nicht mehr weiterbehandelt; je 2 der restlichen 6 Ausstriche wurden noch in eine bestimmte Kernfärbelösung (Giemsa, Hämalaun, Hämatoxinilin) ge-

gesteckt, nach 5 min. herausgenommen, nochmals mit Leitungswasser abgespült und luftgetrocknet. Unter dem Lichtmikroskop wurden bei 320-facher Vergrößerung die Zellen begutachtet.

Ergebnis:

Färbung	Beurteilung
OM	Kerne der Lympho- und Leukozyten violett, HbF-Zellen rot. Gut zu unterscheiden.
AEM	Kerne und HbF-Zellen dunkelblau. Unterscheidung schwierig.
AEM + Giemsa's Lösung (verdünnt 1:10 mit Aqua dest.)	Kerne und HbF-Zellen dunkelviolett. Unterscheidung ebenfalls schwierig.
AEM + saure Hämalaun- lösung nach P. Mayer	Kerne dunkelviolett-blau, HbF-Zellen dunkelblau. Unterscheidung meistens gut möglich.
AEM + saures Hämatoxin nach Ehrlich	Kerne violett, HbF-Zellen dunkelblau. Deutlich zu unterscheiden.

Zusammenfassung:

Im allgemeinen ist es für einen geübten Untersucher nicht schwer, auch ohne Kernfärbung HbF-Zellen von kernhaltigen Zellen zu unterscheiden. Nur in einigen besonderen Fällen, bei denen es auf sehr große Genauigkeit ankommt, z. B. bei feto-maternaler Mikrotransfusion, ist deshalb eine Kernfärbung mit saurem Hämatoxilin nach Ehrlich (5 min.) im Anschluß an die AEM zu empfehlen.

IV. TEMPERATURBEDINGUNGEN (Abb. 29 - 31)

Versuchsbeschreibung:

Das Fixations- und das Elutionsmittel wurden im Warmebad bzw. im Gefrierschrank auf eine bestimmte Temperatur gebracht (Kontrolle mit einem in $^{\circ}\text{C}$ geeichten Thermometer); beim Erreichen der gewünschten Temperatur wurden sie herausgenommen und 3 Blutaussstriche (2 Misch- und 1 Erwachsenenblutaussstrich) darin gefärbt (s. S. 6, Fixation jedoch in 78 % Äthanol). Die abschließende Wässerung erfolgte mit Leitungswasser (konstant ca. 15°C). Begutachtung der Präparate im Lichtmikroskop bei 320-facher Vergrößerung.

Ergebnis:

Temperatur	Beurteilung
40°C	HbA-Zellen nicht ganz vollständig eluiert, aber trotzdem HbA-, I- und HbF-Zellen gut zu unterscheiden (Abb. 29)
30°C	HbA-Zellen vollständig eluiert, HbF-Zellen ebenso wie bei 40°C homogen dunkelblau, I-Zellen hellblau gefärbt. Sehr gute Unterscheidung möglich (Abb. 30)

22°C	Wie bei 30°C.
10°C	Luftbläschen auf dem Objektträger! HbA-Zellen vollständig eluiert, Zellwände schwächer sichtbar. HbF-Zellen nicht mehr homogen dunkelblau, sondern mit eluierten Stellen, außerdem deformiert (Abb. 31)
0°C	Luftbläschen! Alle Zellen vollständig eluiert, Zellwände kaum mehr sichtbar.

Zusammenfassung:

Die besten Ergebnisse wurden bei Zimmertemperatur und etwas darüber (22 - 30°C) erzielt. Eine Erwärmung im Wasserbad auf 37°C ist nicht erforderlich.

Die weiteren Versuche wurden wie bisher bei Zimmertemperatur durchgeführt.

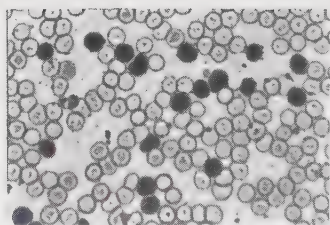


Abb.29 40°C

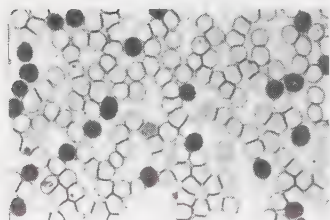
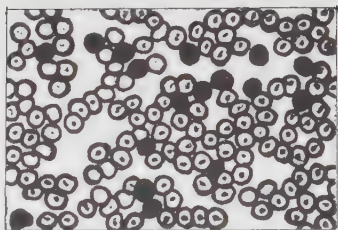


Abb.30 30°C

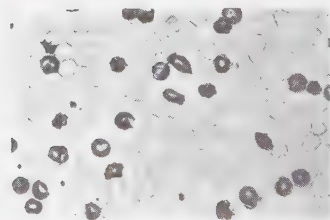
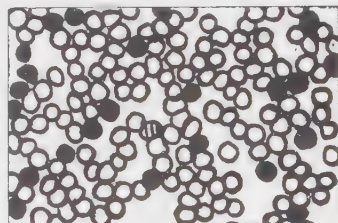


Abb.31 10°C



V. ANTICOAGULANTIEN

V.1 Anticoagulans

Versuchsbeschreibung:

- Vorbereitet wurden - 1 Plastikhütchen (Fassungsvermögen 1 ml) mit 1 Tropfen Heparin (Liquemin^R)
- 1 Plastikhütchen (Fassungsvermögen 1 ml) mit 2 Tropfen Na-Citrat (Natrium citricum 3,8 %)
- 1 EDTA-Röhrchen (Fassungsvermögen ca. 5 ml) = Kunststoffröhrchen, dessen Innenseite mit Na-EDTA-Staub beschichtet ist (wird vom Hersteller fertig geliefert)
- mehrere Objektträger.

Nach Punktion der Vene eines gesunden Erwachsenen mit einer Kanüle ließ man in die 3 Behälter jeweils ca. 1 ml Blut tropfen, vermischte Blut und Anticoagulans durch leichtes Schütteln und fertigte von jeder Sorte 4 dünne Ausstriche an. Dann wurde von der Versuchsperson mit Hilfe eines Hämostilettes aus der Fingerbeere Kapillarblut entnommen und dieses Frischblut (ohne gerinnungshemmende Zusätze) ebenfalls auf 4 Objektträger ausgestrichen.

2 Ausstriche jeder Testgruppe wurden 1 Stunde, 2 Aus-

striche 1 Tag lang luftgetrocknet und dann nach der AEM gefärbt (s. S. 6, jedoch Fixation in 78 % Äthanol).

Der ganze Vorgang wurde mit Nabelschnurblut bzw. Kapillarblut (aus der Ferse) eines Neugeborenen wiederholt. Abschließend Begutachtung aller Präparate im Lichtmikroskop bei 320-facher Vergrößerung.

Für die Beurteilung wurden Erwachsenen- und Neugeborenen- ausstriche (diese enthielten ebenfalls einige HbA-Zellen) zusammengefaßt. Ebenso wurden die Ergebnisse nach 1 Stunde und nach 1 Tag Lufttrocknung gemeinsam aufgeführt, da zwischen ihnen kein Unterschied bestand.

Ergebnis:

Anticoagulans

Beurteilung

(=Frischblut)

HbA-Zellen vollständig eluiert, Zellgrenzen glatt, heben sich deutlich von den dunkelblauen HbF- und hellblauen I-Zellen ab.

Heparin

Wie bei Frischblut.

Citrat

HbA-Zellen vollständig eluiert, aber Zellgrenzen teilweise unscharf, heben sich deshalb weniger deutlich von den übrigen Zellen ab; diese wie bei Frischblut glattrandig, HbF-dunkel-, I-Zellen hellblau.

EDTA

Wie bei Citrat.

Zusammenfassung:

Heparin- und Frischblut schienen am besten für die AEM geeignet. Bei Citrat- und EDTA-Blut konnte man zwar ebenfalls die 3 Zellarten eindeutig voneinander unterscheiden, jedoch machte die beobachtete Unschärfe der HbA-Zellen eine genauere und längere Untersuchung der Neugeborenenausstriche notwendig.

Ob für diese morphologische Veränderung der HbA-Zellen evtl. die Anticoagulantienkonzentration von Bedeutung war (die bei diesem Versuch nicht sonderlich beachtet wurde) sollte im nächsten Experiment (V.2) geklärt werden.

Für alle bisherigen und die weiteren Versuche wurde meist Heparin- oder Citrat-, selten auch EDTA-Blut verwendet.

V.2 Konzentration des Anticoagulans (Abb. 32 - 36)

Versuchsbeschreibung:

In 2 Spritzen wurde eine bestimmte Menge Na-Citrat (Natrium citricum 3,8 %) aufgezogen; die eine wurde mit venösem Erwachsenenblut, die andere mit Neugeborenenblut gleicher Blutgruppe soweit aufgefüllt, daß das Verhältnis Citrat:Blut genau 1:10 betrug. Nun wurden die beiden Blutsorten im Verhältnis Neugeborenen- : Erwachsenenblut = 1:10 gemischt. Dieses Mischblut wurde in 4 Portionen aufgeteilt, von denen eine ohne weitere Behandlung blieb (also 10 % Citrat enthielt); die übrigen wurden durch Zugabe einer jeweils genau berechneten Menge Na-Citrat verdünnt auf Citratkonzentrationen von 20, 50 und 80 %.

Zum Vergleich wurde auch noch Heparinblut abgenommen: In 2 Spritzen wurde nur soviel Heparin (Liquemin^R) aufgezogen, daß die Innenwände beim Zurückziehen des Stempels gerade benetzt waren. Dann Einfüllen von Erwachsenen- bzw. Neugeborenenblut. Anschließend ebenfalls Mischung der beiden Blutsorten im Verhältnis 1:10.

Nun wurden von allen 5 Mischblutproben je 2 Ausstriche angefertigt, luftgetrocknet, nach der AEM gefärbt (s. S. 6, Fixation jedoch bei 78 % Äthanol) und im Lichtmikroskop bei 320-facher Vergrößerung begutachtet.

Ergebnis:

Anticoagulantien-
konzentration

Beurteilung

Heparin 1-5 %

HbA-Zellen vollständig eluiert,
glattrandig; HbF-Zellen homogen dun-
kelblau, I-Zellen homogen hellblau,
alle morphologisch einwandfrei
(Abb. 32)

Citrat 10 %

Ähnlich wie bei Heparin, jedoch HbF-
Zellen vereinzelt Vakuolen (Abb. 33)

Citrat 20 %

HbA-Zellen etwas weniger scharf,
HbF-Zellen vermehrt Vakuolen. Noch
gute Unterscheidung möglich (Abb. 34)

Citrat 50 %

HbA-Zellwände fast völlig aufgelöst,
HbF-Zellen heller blau, mit vielen
Vakuolen, ungleichmäßig gefärbt
(Abb. 35)

Citrat 80 %

HbA-Zellen völlig zerstört, HbF-Zel-
len ebenfalls in ihrer Struktur zer-
stört, von zahlreichen Vakuolen
durchsetzt, aber noch als verschie-
den blau gefärbte Zellbruchstücke
erkennbar (Abb. 36)

Zusammenfassung:

Das beste Ergebnis wurde mit Heparinblut und mit Citratblut im Verhältnis Citrat:Blut = 1:10 erzielt.

Bei höheren Citratkonzentrationen wurde dagegen eine zunehmende morphologische Veränderung der Zellen bis zu ihrer völligen Zerstörung beobachtet.

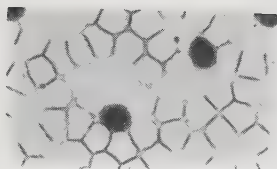


Abb. 32
Heparin 1-5 %

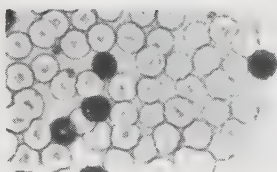
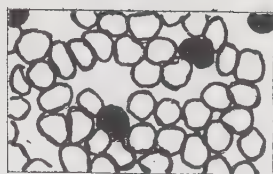


Abb. 33
Citrat 10 %

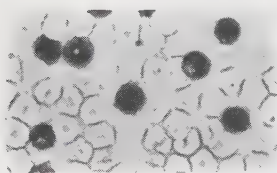
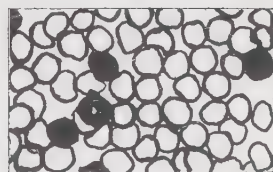


Abb. 34
Citrat 20 %

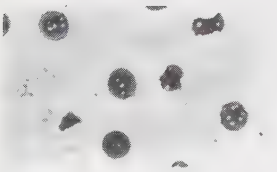
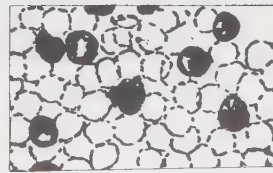


Abb. 35
Citrat 50 %

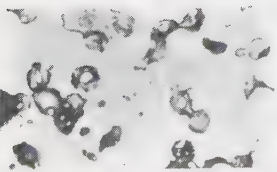
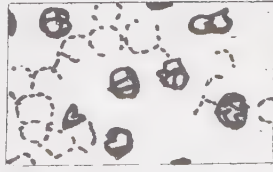


Abb. 36
Citrat 80 %



VI. TROCKNUNGSZEIT DER BLUT AUSSTRICHE

Versuchsbeschreibung:

Von frisch gewonnenem Heparinblut wurden 14 dünne Mischblutausstriche angefertigt und bei Raumtemperatur getrocknet. Nach 1 min., 10 min.....120 min. Trocknungszeit wurden je 2 Ausstriche nach der AEM gefärbt (s. S. 6, Fixation jedoch bei 78 % Äthanol). Abschließend Beurteilung der Präparate im Lichtmikroskop bei 320-facher Vergrößerung.

Ergebnis:

Trocknungszeit	Beurteilung
1 min.	HbA-Zellen eluiert, aber z. T. völlig zerstört. HbF-Zellen hell- bis mittelblau gefärbt.
10 min.	Wie bei 1 min., jedoch HbF-Zellen etwas dunkler blau gefärbt.
20 min.	HbA-Zellen teilweise noch etwas unscharf, aber schon gut zu erkennen. HbF- und I-Zellen gut zu unterscheiden.
30 min.	HbA-Zellgrenzen noch schärfer, sonst wie bei 20 min.

40 min.	HbA-Zellen scharf begrenzt; HbA-, I- und HbF-Zellen gut voneinander zu unterscheiden.
60 min.	Wie bei 40 min.
120 min.	Wie bei 40 min.

Zusammenfassung:

Wurden die Ausstriche nur 1 - 20 min. getrocknet, so war eine sichere Beurteilung nicht möglich. Bei 20 - 40 min. Trocknungszeit waren zwar die HbA-Zellgrenzen noch etwas unscharf, die einzelnen Zellarten konnten jedoch bereits gut voneinander unterschieden und ausgezählt werden. Die besten Ergebnisse wurden bei einer Trocknungszeit von 40 min. und länger erzielt.

Im Rahmen verschiedener anderer Versuche wurde beobachtet, daß Blut, das einige Stunden bis mehrere Tage im Kühlschrank aufbewahrt worden war, nach dem Aufstreichen auf Objektträger ebenfalls mindestens 40 min., möglichst sogar noch länger trocknen soll, bevor es nach der AEM gefärbt wird.

VII. HALTBARKEIT DER BLUTAUSSTRICHE

Versuchsbeschreibung:

Von heparinisiertem Erwachsenenblut und Mischblut wurden mehrere Ausstriche angefertigt. Ein Teil der Ausstriche wurde in einer Schachtel in einem Schrank bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Der andere Teil wurde, ebenfalls in einer Schachtel, in den Kühlschrank gestellt.

Nach 4 std., 1 Tag, 6 Wochen Aufbewahrung wurden aus jeder Schachtel je 4 Ausstriche (2 Erwachsenen- und 2 Mischblutausstriche) herausgenommen und nach der AEM (s. S. 6, Fixation in 78 % Äthanol) gefärbt. Anschließend Begutachtung im Lichtmikroskop bei 320-facher Vergrößerung.

Zusammenfassendes Ergebnis:

Nach 4 std., 1 Tag, 3, 7, 14 Tagen Aufbewahrung waren in den Präparaten die HbA-, I- und HbF-Zellen durch ihre Färbung und Morphologie einwandfrei voneinander zu unterscheiden: HbA-Zellen voll eluiert, scharf begrenzt, I-Zellen hellblau, HbF-Zellen dunkelblau. Bei den 3 und 6 Wochen alten Ausstrichen wurden teilweise, v. a. an dickeren Stellen, vermehrt I-Zellen

beobachtet.

Zwischen der Aufbewahrung bei Raum- und Kühlschranktemperatur bestand kein Unterschied, außer daß bei letzterer etwas mehr Luftbläschen zu sehen waren.

VIII. AUFBEWAHRUNG DER LÖSUNGEN

Versuchsbeschreibung:

Es wurden 1 l Fixationslösung (780 ml Äthanol + 220 ml Aqua dest.) und 1 l Elutionslösung (1 g Amidoschwarz + 1 l 80 % Äthanol + 1 N HCl bis pH 2) je in eine dunkelbraun getönte Glasflasche gefüllt, mit einem Drehverschluß verschlossen und in einem Schrank bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

Bei Bedarf wurden aus jeder Flasche ca. 150 ml Lösung in je ein kleineres Gefäß umgefüllt und darin Blutausstriche wie üblich fixiert und gefärbt. In ein und derselben Lösung konnte eine Reihe von Färbungen durchgeführt werden und es dauerte meist mehrere Tage, bis sie verunreinigt war; dann wurde sie durch eine ungebrauchte Lösung aus der Vorratsflasche ersetzt.

Ergebnis:

Wie die einwandfrei gefärbten Blutaussstriche zeigten, waren die Lösungen selbst nach ca. 6 Monaten Aufbewahrung noch gut brauchbar. In der Elutionslösung setzte sich nach längerem Stehen ein Bodensatz aus Amidoschwarz ab, der jedoch durch Filtrieren beseitigt werden konnte.

IX. VERGLEICHSUNTERSUCHUNGEN

IX.1 Vergleich von AEM und OM

Versuchsbeschreibung:

Neugeborenen- und Erwachsenenblut gleicher Blutgruppe wurden im Verhältnis 1:10, 1:100 und 1:1000 gemischt und von jeder Verdünnung 6 Blutaussstriche angefertigt; je 3 davon wurden nach der AEM (s. S. 6, Fixation in 78 % Äthanol), 3 nach der OM (s. S. 4) gefärbt. Nach Auszählung der HbF-Zellen unter dem Lichtmikroskop bei 320-facher Vergrößerung wurde jeweils der Mittelwert aus 3 Präparaten gebildet.

Ergebnis: Tabelle 4

Verdünnung NB:EB	HbF-Zellen pro 1000 Erythrozyten	
	AEM	OM
1:10	92	73
1:100	8,2	9,2
1:1000	1,2	1,5

Zusammenfassung:

Wie aus der Tabelle ersichtlich ist wurden mit der AEM und der OM etwa dieselben Ergebnisse erzielt; die beobachteten geringen Abweichungen der HbF-Zellzahlen liegen noch im normalen Fehlerbereich und sind wohl zum großen Teil durch die künstliche Mischung bedingt.

IX.2 Vergleich von AEM und quantitativer HbF-Bestimmung

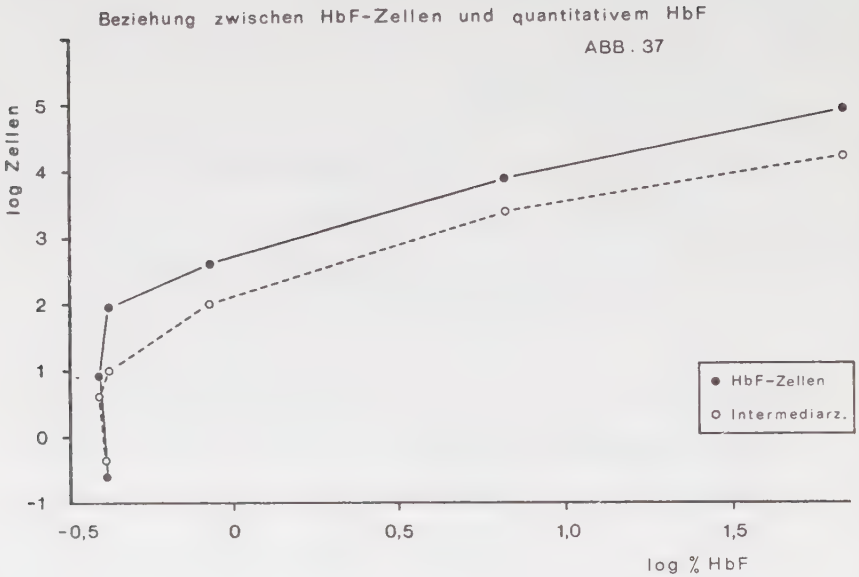
(Abb. 37)

Versuchsbeschreibung:

Von Neugeborenen- und Erwachsenenblut gleicher Blutgruppe wurde durch Mischen im Verhältnis 1:10, 1:1001:100 000 eine Verdünnungsreihe hergestellt, von jeder Verdünnung wurden 2 Blutaussstriche angefertigt und nach der AEM (s. S. 6, Fixation in 78 % Äthanol) gefärbt. Unter dem Lichtmikroskop wurden bei 320-facher Vergrößerung die HbF- und I-Zellen ausgezählt und jeweils der Mittelwert aus 2 Präparaten gebildet. Parallel zu den Färbungen wurde das HbF jeweils quantitativ nach der Methode von BETKE, MARTI u. SCHLICHT (11) gemessen⁺.

⁺ Die quantitativen HbF-Bestimmungen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. T. Sanguansermsri durchgeführt.

Ergebnis: Abb. 37 (Tabelle siehe Anhang)



Zusammenfassung:

Abb. 37 zeigt eine deutliche Korrelation zwischen den ausgezählten HbF-haltigen Zellen und dem quantitativ gemessenen HbF in dem Bereich von 66,8 - 0,85 % HbF, keine Korrelation jedoch mehr bei niedrigeren HbF-Konzentrationen. Für diese geringen HbF-Mengen scheint die quantitative Bestimmungsmethode nicht mehr empfindlich genug, die AEM kann jedoch offensichtlich auch kleinste Mengen HbF noch erfassen.

X. EINFLUSS HOHER RETIKULOZYTENZAHLEN

Es sollte geklärt werden, ob sich Retikulozyten auch nach Färbung mit der AEM als Intermediärzellen darstellen und mit diesen verwechselt werden können, wie dies bei der OM der Fall ist (34)

Versuchsbeschreibung:

Es wurde nur Blut von Patienten entnommen, die

- älter als 3 Jahre waren
- im Blut eine hohe Retikulozytenzahl aufwiesen
- weniger als 0,8 % HbF hatten (quantitativ bestimmt mit der Methode von BETKE, MARTI und SCHLICHT (11)).

War das Blut aus der Vene entnommen und ungerinnbar gemacht, dann wurden 3 Gruppen gebildet:

- 1) Von 1 ml dieses Blutes wurden sofort 6 Ausstriche angefertigt
- 2) 1 ml Blut wurde mit 1 ml Nilblausulfatlösung (NBS) 20 min. im Brutschrank bei 37°C inkubiert und diese Mischung anschließend auf 9 Objektträger ausgestrichen.

NBS = 100 mg Nilblausulfat in 100 ml 0,9 % NaCl, wird zur Retikulozytenfärbung verwendet.
- 3) 1 ml Blut wurde in gleicher Weise mit 1 ml Brillantkresylblaulösung (BKB) inkubiert und davon wurden ebenfalls 9 Ausstriche angefertigt.

BKB = 100 mg Brillantkresylblau in 100 ml 0,9 % NaCl,
färbt wie NBS Retikulozyten an.

Alle 24 Ausstriche wurden dann ca. 1 Std. bei Raumtemperatur liegengelassen. Anschließend wurden

- je 3 Ausstriche von 1), 2) und 3) nach der OM gefärbt
- je 3 Ausstriche von 1), 2) und 3) nach der AEM gefärbt
- je 3 Ausstriche von 2) und 3) blieben ohne weitere Behandlung; bei ihnen wurden unter dem Lichtmikroskop bei 800-facher Vergrößerung mit Ölimmersion die Retikulozyten pro 1000 Erythrozyten ausgezählt.

Von allen übrigen, nach der OM bzw. AEM gefärbten Ausstrichen wurden unter dem Lichtmikroskop bei 320-facher Vergrößerung die Intermediärzellen pro 1000 Erythrozyten ausgezählt. Aus dem Ergebnis von jeweils 3 gleichen Ausstrichen wurde der Mittelwert gebildet.

Ergebnis: Tabelle 5 (siehe Anhang)

Zum Vergleich wurden die ausgezählten Intermediärzellen in Tabelle 5 aufgeführt. Die Gegenüberstellung von nicht vorbehandelten und mit Retikulozytenvitalfärbung vorbehandelten, OM bzw. AEM gefärbten Ausstrichen ergab etwa folgende Verhältniszahlen:

OM : (NBS + OM) = 9 : 1

AEM : (NBS + AEM) = 2,2 : 1

OM : (BKB + OM) = 11 : 1

AEM : (BKB + AEM) = 1,6 : 1

Zusammenfassung:

Wie die Gegenüberstellung zeigt, färben sich ohne vorherige Retikulozytenfärbung offensichtlich bei der OM viel mehr Retikulozyten wie I-Zellen an als bei der AEM. Deshalb scheint bei der OM eine Kennzeichnung der Reti mit Brillantkresylblau (notfalls auch mit Nilblausulfat) erforderlich zu sein, während dies bei der AEM bei niederen Retiwerten vernachlässigt werden kann, bei hohen Retizahlen jedoch wegen der größeren Genauigkeit ebenfalls anzuraten ist.

XI. KLINISCHE ANWENDUNG DER AEM

XI.1 HbF bei Erwachsenen (Abb. 38)

Material: -Venenblut (Citrat- oder Heparinblut) von 51 klinisch gesunden deutschen und ausländischen Versuchspersonen (Medizinstudenten, Laborantinnen, Krankenschwestern, Ärzte), -für die AEM notwendige Chemikalien (s. S. 6)

Methode: Von jedem Blut wurden jeweils 2 dünne Ausstriche auf Objektträgern angefertigt, ca. 2 Std. bei Zimmertemperatur getrocknet und dann nach der AEM gefärbt. Es wurden jeweils die Intermediär- und HbF-Zellen pro 2000 Erythrozyten im Lichtmikroskop bei 320-facher Vergrößerung ausgezählt und der Mittelwert aus 2 Präparaten gebildet. Außerdem wurde von jedem Blut auch eine quantitative Bestimmung des HbF nach der Methode von BETKE, MARTI und SCHLICHT (11) vorgenommen.

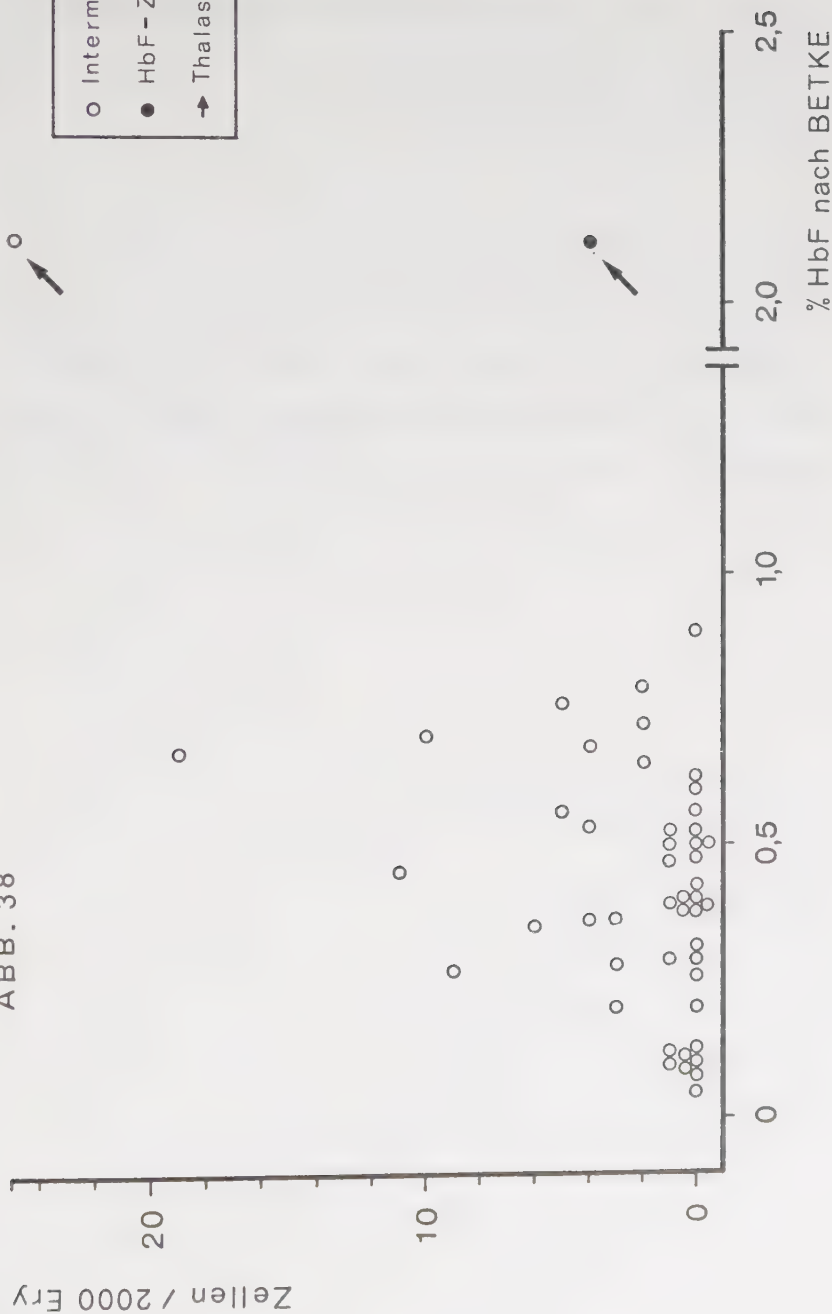
Ergebnis: Abt. 38 (Tabelle s. Anhang)

Zusammenfassung:

Von den 51 Erwachsenen war der quantitativ bestimmte HbF-Wert bei 50 Personen stets kleiner als 1 %, dementsprechend wurden im Ausstrich nie HbF-Zellen gefunden. Es wurden jedoch verschiedentlich I-Zellen beob-

HbF-haltige Zellen und quantitatives HbF bei Erwachsenen

ABB. 38



achtet, ihre Zahl schwankte zwischen 0 und 19 pro 2000 Erythrozyten. Es fanden sich bei

26 Personen keine

19 Personen 1 bis 5

3 Personen 6 bis 10

1 Person 11 und

1 Person 19 I-Zellen pro 2000 Erys.

Bei einer Versuchsperson betrug das quantitativ gemessene HbF 2,21 % und im Ausstrich wurden 4 HbF-Zellen und 25 I-Zellen pro 2000 Erythrozyten gezählt. Bei dieser Versuchsperson wurde später eine Thalassämia minor festgestellt.

XI.2 HbA bei Neugeborenen (Abb. 39)

- Material:** Venenblut (EDTA-Blut) von 62 nicht ausgewählten Neugeborenen innerhalb der ersten 3 Lebenstage.
- Methode:** Von jedem Blut wurden 2 Ausstriche angefertigt, getrocknet, nach der AEM gefärbt und unter dem Lichtmikroskop bei 320-facher Vergrößerung auf HbA-Zellen untersucht. Ausgezählt wurden die HbA-Zellen pro 1000 Erythrozyten, dann wurde der Mittelwert aus 2 Präparaten gebildet.
- Ergebnis:** Abb. 39 (Tabelle s. Anhang)

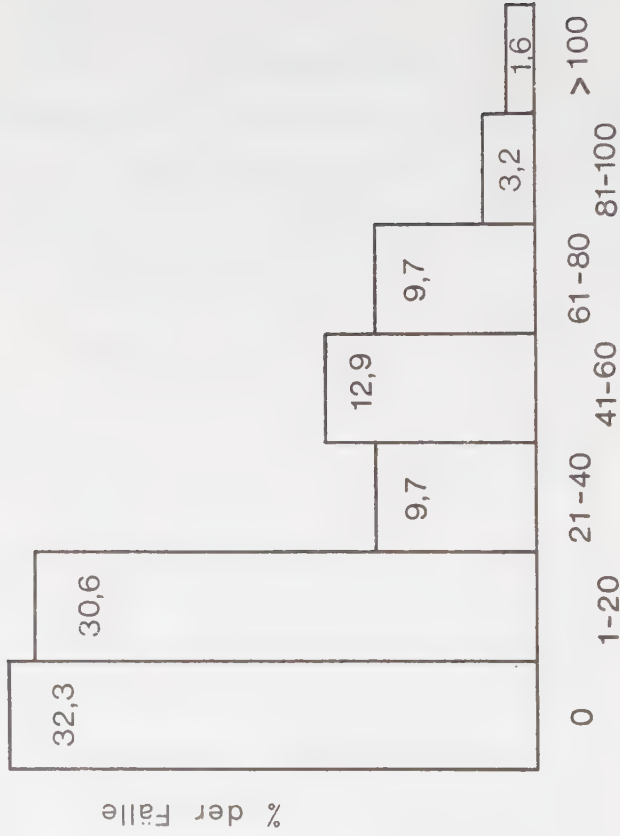
Zusammenfassung:

Bei den 62 Neugeborenen differierten die HbA-Zellzahlen zwischen 0 und 158 pro 1000 Erythrozyten. In 20 Fällen (32,3 %) wurden keine, in 19 Fällen (30,6 %) 1 bis 20 und in 20 Fällen (32,3 %) 21 bis 80 HbA-Zellen gefunden. Nur bei 2 Neugeborenen (3,2 %) wurden 81 bis 100 und nur bei 1 Neugeborenen (1,6 %) 158 HbA-Zellen gezählt.

Bei den gefundenen HbA-Zellen kann mit der angewendeten Elutionsmethode nicht mehr weiter unterschieden werden, ob sie nun HbA oder HbA₂ enthalten. HbA wird bereits vom Fet in geringen Mengen gebildet, HbA₂ ent-

HbA - Zellen bei Neugeborenen (0-3 Tg.)

ABB. 39



HbA - Zellen / 1000 Ery

wickelt sich erst nach der Geburt. Demnach könnten die gefundenen HbA-Zellen verschieden interpretiert werden:

1. Sie wurden vom gesunden Neugeborenen selbst gebildet und wären als Reifezeichen zu werten. In diesem Fall würde man einen hohen Anteil an I-Zellen erwarten, da sich der Übergang von der HbF- zur HbA-bildenden Zelle gleitend vollzieht über das Zwischenstadium der I-Zelle, die beide Hämoglobinarten enthält (8, 13).
2. Sie wurden vom kranken Neugeborenen gebildet, z. B. beim Morbus haemolyticus neonatorum, wo eine vermehrte HbA-Produktion als Folge des erhöhten Blutumsatzes angenommen wird (34).
3. Sie stammen von der Mutter, gelangten also diaplazentar in den fetalen Kreislauf (34); dies wäre vor allem bei Neugeborenen mit Polyglobulie, hohen HbA- und geringen I-Zellzahlen anzunehmen.

Die Frage der materno-fetalen Transfusion konnte mit der HbA₂-Fluoreszenzmethode (HOSOI, 30, HELLER und YAKULIS, 24) von BETKE und SANGUANSEMSRI (13) genauer geklärt werden.

XI.3 HbA und HbF bei Neugeborenen (Abb. 40)

Material: Venenblut (EDTA-Blut) von 43 nicht ausgewählten Neugeborenen innerhalb der ersten 7 Lebenstage.

Methode: Das Blut wurde jeweils auf 2 Objektträger ausgestrichen, getrocknet, nach der AEM gefärbt, die HbA-Zellen pro 1000 Erythrozyten wurden im Lichtmikroskop bei 320-facher Vergrößerung ausgezählt und anschließend wurde der Mittelwert aus 2 Präparaten errechnet. Parallel dazu wurde die quantitative HbF-Bestimmung mittels Alkalidenaturierung (nach BETKE, MARTI und SCHLICHT (11)) durchgeführt

Ergebnis: Abb. 40 (Tabelle s. Anhang)

In Abb. 40 wurde der HbF-Gehalt in % gegen die ausgezählten HbA-Zellen aufgetragen.

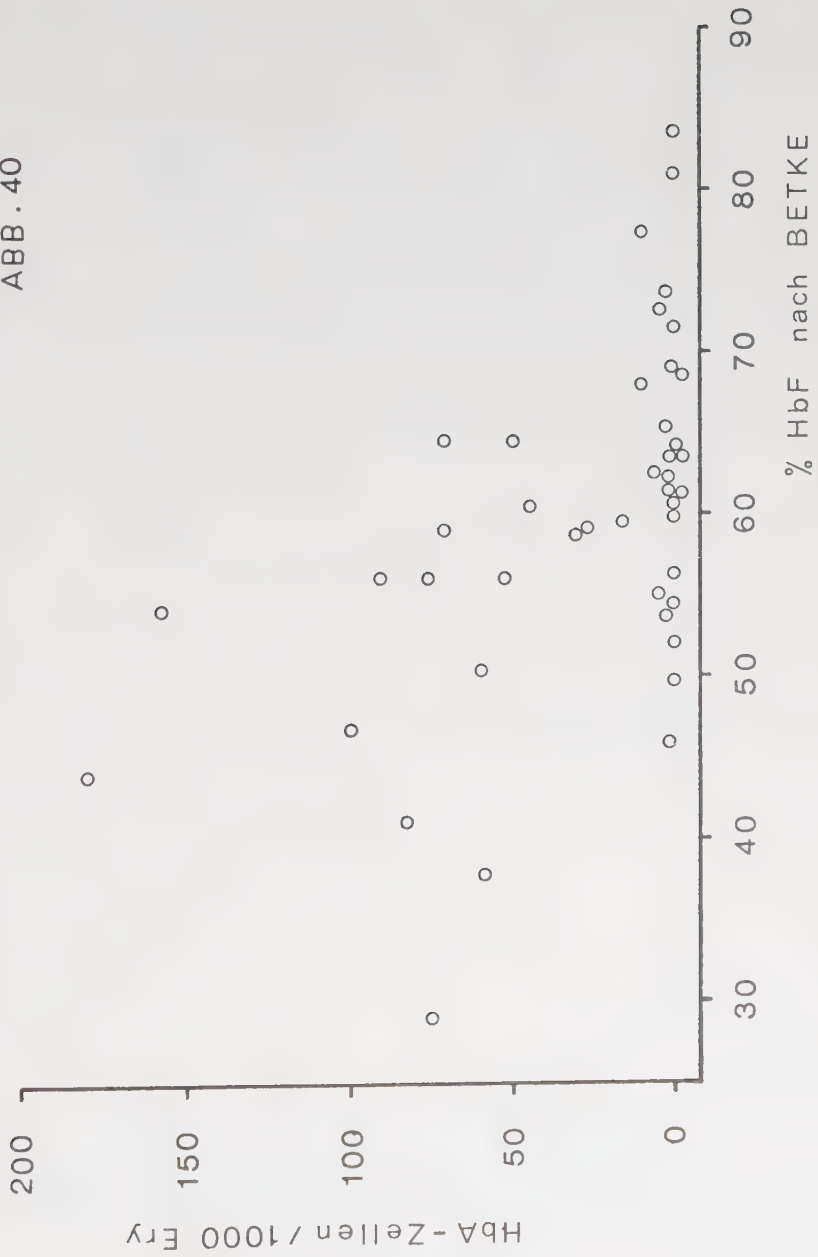
Zusammenfassung:

Aus Abb. 40 ist eine gewisse Korrelation zwischen der Zahl der HbA-Zellen und der quantitativen HbF-Menge ersichtlich. Die Streuung scheint allerdings ziemlich groß, besonders bei Werten von etwa 50 % HbF.

So wurden z. B. bei einem HbF von 54 % in einem Fall (Kind Nr. 42) keine HbA-Zellen gefunden, in einem an-

HbA-Zellen u. quantitatives HbF bei Neugeborenen (0-7 Tg.)

ABB. 40



deren Fall (Kind Nr. 8) jedoch 158 HbA-Zellen pro 1000 Erythrozyten gezählt. Dies könnte dahingehend interpretiert werden, daß im Fall Nr. 42 nur HbF- und I-Zellen gefunden wurden, das Kind demnach noch einen geringeren Reifegrad hatte, während das Kind Nr. 8 entweder schon einen höheren Reifegrad erreicht hatte, also bereits entsprechend viele eigene HbA-Zellen gebildet hat oder aber, daß bei diesem Kind eine materno-fetale Transfusion stattgefunden hatte.

XI.4 HbF bei Frauen nach Entbindung

Material: Blut von 47 gesunden Frauen (aus der Fingerbeere) innerhalb von 2 Tagen nach Geburt ihres Kindes. Ausgewählt wurden nur Frauen, deren Geburt komplikationslos verlaufen war.

Methode: Von jedem Blut wurden jeweils 2 Ausstriche angefertigt⁺, getrocknet, nach der AEM gefärbt und anschließend unter dem Lichtmikroskop bei 320-facher Vergrößerung auf HbF-Zellen untersucht: an 20 verschiedenen Stellen des Präparates wurden die HbF-Zellen gezählt, jedes Gesichtsfeld enthielt im Durchschnitt etwa 500 Erythrozyten, so daß sich insgesamt die Zahl der HbF-Zellen pro 10000 Erythrozyten ergab. Für die Tabelle wurde jeweils der Mittelwert aus 2 Präparaten gebildet.

Ergebnis: Tabelle 6 (s. Anhang).

⁺ Für die Überlassung der Blutaussstriche danke ich der
II. Universitätsfrauenklinik München sehr herzlich.

Zusammenfassung:

Wie Tabelle 6 zeigt, waren 9 der 47 Ausstriche HbF positiv, d. h. bei diesen Frauen wurden nach der Geburt HbF-Zellen gefunden; und zwar wurden bei 4 Frauen 2 HbF-Zellen gefunden, bei 2 Frauen eine HbF-Zelle, bei 2 Frauen 4 und bei einer Frau 3 HbF-Zellen pro 10 000 Erythrozyten. In diesen neun Fällen hatte also offensichtlich eine geringe fetomaternale Transfusion stattgefunden. Bei den übrigen 38 Frauen konnten keine HbF-Zellen nachgewiesen werden.

F. Z U S A M M E N F A S S U N G

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Bedingungen herauszufinden, unter denen mit der Amidoschwarz-Elutions-Methode (AEM) fetale und adulte Erythrocyten, d. h. HbF- und HbA-haltige rote Zellen bzw. Intermediärzellen (I-Zellen), am besten voneinander unterschieden werden können. Zu diesem Zweck habe ich

- 1) verschiedene Fixationsmittel erprobt
- 2) die Konzentration des Fixationsmittels verändert
- 3) die Fixationszeit variiert
- 4) die Präparate nach der Fixation unterschiedlich behandelt
- 5) unterschiedliche Alkoholarten in der Elutionslösung geprüft
- 6) die Konzentration des Alkohols in der Elutionslösung verändert
- 7) verschiedene Färbemittel erprobt
- 8) die Menge des Färbemittels variiert
- 9) mehrere Säuren als Elutionsmittel versucht
- 10) den pH-Wert der Elutionslösung abgeändert
- 11) das einem gewissen pH-Wert entsprechende Säurevolumen bestimmt
- 12) die Elutionszeit verlängert bzw. verkürzt
- 13) die Zellkerne mit verschiedenen Färbemitteln anzufärben versucht

- 14) die AEM unter verschiedenen Temperaturbedingungen getestet
- 15) mehrere Antikoagulantien zur Gerinnungshemmung des Blutes erprobt
- 16) und zwar in unterschiedlichen Konzentrationen
- 17) die ungefärbten Blutaussstriche verschieden lang getrocknet
- 18) bzw. bis zu mehreren Wochen lang aufbewahrt und auf ihre Haltbarkeit geprüft
- 19) ebenso die gebrauchsfertigen Lösungen auf ihre Haltbarkeit geprüft

Außerdem habe ich

- 20) AEM und die Original-Elutionsmethode nach BETKE u. KLEIHAUER miteinander verglichen
- 21) AEM und quantitative Bestimmung des HbF einander gegenübergestellt
- 22) eine mögliche Verfälschung des Ergebnisses durch hohe Retikulozytenzahlen untersucht.

Nach meinen Untersuchungsergebnissen erzielt man mit der AEM die besten Ergebnisse, wenn man sie nach folgendem Vorschlag durchführt:

- 1) Man entnimmt Venen- oder Kapillarblut und streicht es entweder sofort dünn auf einen Objektträger aus oder versetzt es vorher mit Heparin; die Wände des Auffanggefäßes werden dabei zuerst mit Heparin benetzt und dann mit Blut gefüllt. Statt Heparin kann auch Natrium-Citrat als Anticoagulans im Verhältnis Na-Citrat : Blut = 1 : 10 verwendet werden. Notfalls kann man das Blut auch in mit Na-ELTA-Staub beschichteten Körnchen auffangen. Das ungerinnbar gemachte Blut hat den Vorteil, daß man es etwa bis zu einer Woche lang im Kühlschrank aufbewahren kann.
- 2) Von dem entsprechenden Blut fertigt man dünne Ausstriche auf Objektträgern an und trocknet sie mindestens 40 min. bei Raumtemperatur; auch nach 24 Std. Trocknungszeit und selbst nach 14-tägiger Aufbewahrung der Ausstriche in einem Schrank bei Raumtemperatur oder im Kühlschrank wurden noch die gleichen Ergebnisse erzielt (die 14-tägige Trocknungszeit wurde jedoch nur mit Heparinblut geprüft).
- 3) Die getrockneten Ausstriche stellt man in eine Fixationslösung aus 77-78 % Äthanol; auch Konzentrationen von 75-80 % waren brauchbar, statt Äthanol kann man notfalls auch Metnanol verwenden.
Die vorgeschriebene Konzentration erhält man durch Verdünnen von absolutem Äthanol mit Aqua dest.

4) Nach 2-5 min. Fixationszeit (notfalls bis 60 min.) nimmt man die Ausstriche heraus, läßt sie kurz abtropfen und stellt sie dann sofort in die Elutionslösung. Wäre eine Unterbrechung des Färbevorganges erwünscht, so könnte man die Ausstriche nach der Fixation 20-60 min. luft-trocknen lassen und erst dann eluieren.

5) Die Elutionslösung wird hergestellt aus 100 ml 70-80 % Äthanol (statt Äthanol evtl. auch Propanol), 100 mg Amidoschwarz-10 B (evtl. auch 50-200 mg; statt Amidoschwarz könnte man auch Erythrosin verwenden, die HbF-Zellen färben sich dann jedoch rot statt dunkelblau, die I-Zellen rosa statt hellblau), 1N Salzsäure (HCl) bis zu einem pH-Wert von 2,2 - 1,6, einzustellen mit dem pH-Meter.

Diesen pH-Bereich kann man auch ohne pH-Meter durch Zugabe von 2,0 - 8,0 ml 1N HCl (bei 21°C) erreichen. Will man jedoch sicher im erforderlichen pH-Bereich liegen - unabhängig von Temperaturschwankungen - so gibt man am besten 4 ml 1N HCl in die Lösung und liegt damit zwischen pH 2,0 - 1,8.

6) Nach einer Elutionsdauer von 2-5 min. (notfalls bis 30 min) nimmt man die Objektträger aus der Elutionslösung, spült sie unter fließendem Leitungswasser oder mit Aqua dest. kurz ab und läßt sie aufgestellt an der Luft trocknen.

7) Die AEM wird am besten bei Zimmertemperatur (etwa 22 - 30°C) durchgeführt. Eine Erwärmung der Lösungen auf 37°C ist nicht notwendig.

- 8) Fixations- und Elutionslösung kann man als Vorrat in größerer Menge herstellen (z. B. je 1 l) und in dunkelbraun getönten Glasflaschen mit Drehverschluß bei Zimmertemperatur mindestens 6 Monate lang aufbewahren. In der Elutionslösung kann sich zwar nach längerem Stehen ein Bodensatz aus Amidoschwarz absetzen, dieser ist aber durch Filtrieren leicht zu beseitigen. Bei Bedarf füllt man jeweils ca. 150 ml Lösung in ein kleineres Gefäß und fixiert bzw. färbt darin die Blutausstriche. In ein- und derselben Lösung kann man i. a. mehrere Tage lang eine Reihe von Färbungen durchführen, erst wenn sie verunreinigt ist, ersetzt man sie durch ungebrauchte Lösung aus der Vorratsflasche.

Selbst bei genauer Einhaltung der experimentell gefundenen optimalen Bedingungen ist bei der AEM auf folgende Fehlerquellen zu achten:

- Amidoschwarz färbt nicht nur HbF-Zellen, sondern auch Kerne von Leuko- und Lymphozyten dunkelblau an. So ist es möglich, daß einzelne kleine Lymphozyten - etwa von der Größe eines Erythrozyten - mit HbF-Zellen verwechselt werden können.

Zur Vermeidung dieses Fehlers kann man die nach der AEM gefärbten Ausstriche nach dem Abspülen mit Leitungswasser noch 5 min. lang in saures Hämatoxilin nach EHRLICH stecken, nochmals mit Wasser abspülen und lufttrocknen. Dadurch färben sich die Kerne violett an und sind nun besser von den dunkelblauen HbF-Zellen zu unterscheiden.

- Bei Färbung nach der AEM können Retikulozyten als I-Zellen erscheinen, jedoch ist dies weitaus weniger der Fall als bei der OM. Kommt es auf besonders große Genauigkeit an oder besteht eine Retikulozytose, so ist eine Retikulozytenvitalfärbung anzuraten:

Man mischt Blut mit Brillantkresylblau im Verhältnis 1:1 und inkubiert es 20 min. im Brutschrank bei 37°C. Dann dünn auf Objektträger ausstreichen und nach der AEM färben. Die Retikulozyten sind dann deutlich an der Substantia granulofilamentosa erkennbar.

Führt man die AEM wie angegeben durch, so kann man im Lichtmikroskop am besten bei mittlerer (etwa 320-facher) Vergrößerung die Erythrozyten folgendermaßen differenzieren:

HbF-Zellen dunkelblau

I-Zellen hellblau

HbA-Zellen farblos, d. h. von den leeren

HbA-Zellen ist nur die Wand als konturierter Schatten sichtbar. Abb. 41 - 43 zeigen einen nach der AEM gefärbten Ausstrich von Neugeborenen-, Erwachsenen- und Mischblut (d. h. Neugeborenenblut gemischt mit Erwachsenenblut gleicher Blutgruppe im Verhältnis 1 : 10).

Die Methode wurde im klinischen Einsatz getestet.

Bei 50 Erwachsenen - sie hatten weniger als 1% HbF - waren erwartungsgemäß keine HbF-Zellen, bei 24 Personen allerdings bis zu 10‰ Intermediärzellen nachzuweisen. Bei einer weiteren Person fanden sich 2,21% HbF und im Blutausstrich 2‰ HbF- sowie 12‰ Intermediärzellen; nachfolgend wurde eine Thalassaemia minor gesichert.

Bei 62 nicht ausgewählten Neugeborenen unterschiedlichen Gestationsalters fanden sich 0 bis 158 ‰ HbA-Zellen. Bei 43 Neugeborenen wurde die Korrelation zwischen HbF-Gehalt des Blutes und HbA-Erythrocyten geprüft; sie fiel nicht straff genug aus, um das Verfahren als brauchbar zu empfehlen, das HbF/HbA-Verhältnis quantitativ anzugeben. In 47 Ausstrichen von Wöchnerinnen hingegen ließen sich 9mal HbF-Zellen ermitteln, d.h. bei diesen Frauen waren zuvor fetale Erythrocyten in den mütterlichen Kreislauf übergetreten.

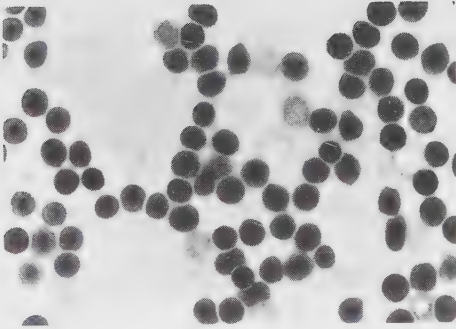


Abb. 41
Neugeborenenblut
Vergr. 320-fach

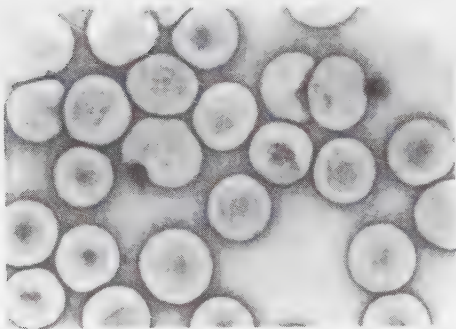


Abb. 42
Erwachsenenblut
Vergr. 800-fach
(Ölimmersion)

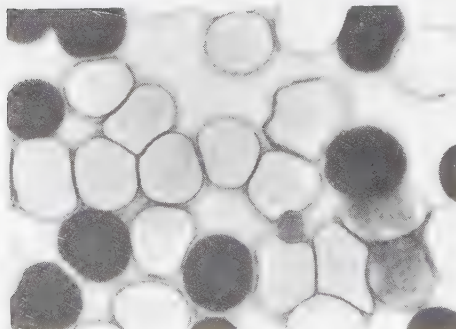


Abb. 43
Mischblut
Vergr. 800-fach
(Ölimmersion)

G. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. Betke, K.: Der menschliche rote Blutfarbstoff. Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1954
2. " : Fetales Hämoglobin und fetale Erythrozyten.
2. Symposion über Funktion u. Struktur der roten Blutzellen. Berlin 1957
3. " : Fetal hemoglobin in health and disease. Proc. VIII Intern. Congr. Hematology, Tokyo 1960
4. " : Diagnose und klinische Bedeutung der Hämoglobinanomalien. Internist (Berl.) 1, 236 (1960)
5. " : Das Hämoglobin und die Hämoglobinanomalien. Sonderdruck aus Handbuch der inneren Medizin, zweiter Band, 1. Teil. Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York 1968
6. " : Cytological differentiation of hemoglobin. Bibl. Haemat. 29, 1085 (1968)
7. " : Fortschritte auf dem Gebiet d. Physiologie u. Pathologie des Hämoglobins. Hippokrates, 40, 529 (1969)
8. " und Kleihauer, E.: Fetalen und bleibenden Blutfarbstoff in Erythrozyten und Erythroblasten von menschlichen Feten und Neugeborenen. Blut 4, 241 (1958)
9. " und Kleihauer, E.: Hämoglobinanomalien in der deutschen Bevölkerung. Schweiz. med. Wschr. 1316 (1962).

10. Betke, K. and Kleihauer, E.: The acid elution technique and the question of the influence of membrane qualities on its results. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* 49, 151 (1969)
11. " , Marti, H. R., Schlicht, I.: Estimation of small percentages of foetal haemoglobin. *Nature (Lond.)* 184, 1877 (1959)
12. " und Nierhaus, K.: Fetales Hämoglobin und fetale Erythrozyten im mütterlichen Blut während der Schwangerschaft und unter der Geburt. *Münch. med. Wschr.* 110, I, 509 (1968)
13. " und Sanguansermsri, T.: Zytologische Blutfarbstoffdifferenzierung. *Münch. med. Wschr.* 114, 1099 (1972)
14. Beaven, G. M., Ellis, M. I. and White, I. C.: Studies on human foetal haemoglobin. I. Dedection and estimation. *Brit. J. Haemat.* 6, 1 (1960 a)
15. Berg, D.: Schwangerschaftsberatung und Perinatologie. Thieme, Stuttgart 1972
16. Bradley, Th. B., Brawner, I. N. and Conley, C. L.: Further observations on an inherited anomaly characterised by persistence of fetal hemoglobin. *Bull. Johns Hopk. Hosp.* 108, 242 (1961)
17. Clarke, C. A., Donohue, W. T. A., McConnell, R. B., Woodrow, I. C., Finn, R., Krevans, I. R., Kulke, W., Lehane, D. and Sheppard, P. M.: Further experimental studies on the prevention of Rh haemolytic disease. *Brit. med. J.* 979 (1963/I)

18. Cohen, F., Zuelzer, W. W., Gustafson, D. C. and Evans, M. M.: Mechanism of isoimmunisation. I. The transplacental passage of fetal erythrocytes in homospecific pregnancies. *Blood* 23, 621 (1964)
19. Cohen, F. and Zuelzer, W. W.: The transplacental passage of maternal erythrocytes into the fetus. *Amer. J. Obst. Gynec.* 92, 566 (1965)
20. Conley, C. L., Weatherall, D. I., Richardson, S. N., Shepard, M. K. and Charache, S.: Hereditary persistence of fetal hemoglobin: A study of 79 affected persons in 15 negro families in Baltimore. *Blood* 21, 261 (1963)
21. Finn, R., Clarke, C. A., Donohoe, W. T. A., McConnell, R. B., Sheppard, P. M. and Lehane, D.: Transplacental passage of red cells in man. *Nature (Lond.)* 190, 922 (1961)
22. Fischer, K. und Müller, V.: Zum Nachweis mütterlicher Erythrozyten im Neugeborenenblut. *Mschr. Kinderheilk.* 115, 147 (1967)
23. Fraser, I. D. and Raper, A. B.: Solubility of denatured haemoglobin variants in acid buffer. *Nature* 191, 355 (1961)
24. Heller, P. and Yakulis, V.: The distribution of hemoglobin A₂. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 165, 54 (1969)
25. Hickl, E. J.: Untersuchung über den fetalen Anteil bei Blutungen in der Spätschwangerschaft.

Gynaekologia 157, 351 (1964)

26. Hindemann, P., Haering, M., Kubli, F., Hinselmann, M., Jedinsky, H., Schneider, J., u. a. (Arbeitsgemeinschaft): Verhütung des Morbus haemolyticus neonatorum durch Anti-D Applikation bei der Mutter. Dtsch. Med. Wschr. 93, 1176 (1968)
27. Hollán, S. R. and Szelényi, J. G.: On methods of differentiating intracellular haemoglobins. Proc. Int. Sympos. Comparat. Hemogl. Structure; Thessaloniki 1966
28. Hollán, S. R. and Szelényi, J. G.: Correlations between erythrocyte membrane and intracellular differentiation of various types of haemoglobin. Proc. XIth Congr. Int. Soc. Haemat.; Sydney 1966
29. Hosoi, T.: Studies on hemoglobin F within single erythrocyte by fluorescent antibody technique. Exp. Cell Res. 37, 680 (1965)
30. Hosoi, T.: Fluorescent antibody technique utilized for studies on cellular distribution of erythrocytic antigens. Acta Haemat. Jap. 31, 138 (1968)
31. Hötzel, U. E.: Adultes und fetales Haemoglobin als Reifezeichen für Neugeborene. Inaug.-Diss. Tübingen 1967
32. Killguss, H.: Untersuchungen zur zytologischen Darstellung von adultem und fetalem Hämoglobin in

Erythrozyten von Blutaussstrichen. Inaug.-
Diss. Tübingen 1968

33. Kiossoglou, K. A., Wolman, I. J., and Garrison, M.:
Fetal hemoglobin containing erythrocytes I.
Blood 21, 553 (1963)
34. Kleihauer, E.: Fetales Hämoglobin und fetale Erythro-
zyten. Beiheft Arch. Kinderhk., 53. Enke-
Verlag Stuttgart 1966
35. " , Betke, K.: Praktische Anwendung des
Nachweises von HbF-haltigen Zellen in fixier-
ten Blutaussstrichen. Internist 1, 292 (1960)
36. " , Betke, K.: Die Verteilung von HbF auf
die Zellpopulation bei verschiedenen Zustän-
den einer Vermehrung von HbF. In: Haemoglo-
bin Colloquium, Wien 1961. Stuttgart, Georg
Thieme 1962
37. " , Braun, H. and Betke, K.: Demonstration
von fetalem Hämoglobin in den Erythrocyten
eines Blutaussstriches. Klin. Wschr. 35, 637
(1957)
38. " , Hötzel, U. und Betke, K.: Die materno-
fetale Transfusion. Mschr. Kinderheilk. 115,
145 (1967)
39. Marti, H. R.: Normale und anormale menschliche Hämoglo-
bine. Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Hei-
delberg 1963
40. Marti, H. R. und Bütler, R.: Hämoglobin F und Hämoglo-
bin A₂-Vermehrung bei der Schweizer Bevöl-

kerung. Acta Haemat. 26, 65 (1961)

41. Marti, H. R. und Betke, K.: Zur Diagnostik der Thassaemia minor: die Bedeutung der Familienuntersuchung. Helv. Med. Acta 27, 652 (1960)
42. Sansone, G. e Massimo, L.: Riconoscimento dei globuli rossi a diverso tipo emoglobinico su strisci di sangue fissati. Importanza del metodo nello studio delle thalassemie. Minerva ped. (Torino) 11, 245 (1959)
43. Michael, A. F., Maurer, A. M.: Maternal-fetal transfusion as a cause of plethora in the neonatal period. Pediatrics 28, 458 (1961)
44. Nierhaus, K. and Betke, K.: Eine vereinfachte Modifikation der sauren Elution für die cytologische Darstellung von fetalem Hämoglobin. Klin. Wschr. 46/I, 47 (1968)
45. Sanguansermsri, T., Kohne, E., Kleihauer, E. u. Betke, K.: A new, simplified acid elution technique for the demonstration of HbF in red cells. Manuskript in Vorbereitung
46. Schneider, I.: The present situation in the prevention of Rh-Sensitization. In: Perinatale Medicine. 1st European Congress Berlin. P. J. Huntingford, K. A. Hüter, E. Saling. Thieme, Stuttgart 1969
47. Shepard, M. K., Weatherall, D. J., and Conley, C. L.: Semi-quantitative estimation of the distribution of fetal hemoglobin in red cell popula-

- tions. Bull. Johns Hopk. Hosp. 110, 293 (1962)
48. Singer, K., Chernoff, A. J., Singer, L.: Studies on abnormal hemoglobins. I. Their demonstration in sickle cell anemia and other hematological disorders by means of alkali denaturation. Blood 6, 413 (1951)
49. Szelényi, J. G. and Hollán, S. R.: A new method for the cytological differentiation of foetal and adult erythrocytes. Vox Sang. 12, 234 (1967)
50. Thompson, R. B., Mitchener, J. W. and Huisman, T. H. J.: Studies on the fetal hemoglobin in the persistent high HbF anomaly. Blood 18, 267 (1961)
51. Tomoda, Y.: Demonstration of foetal erythrocyte by immunofluorescent staining. Nature 202, 910 (1964)
52. Wimhöfer, H., Schneider, J. und Leidenberger, F.: Untersuchungen über die Einschwemmung fetaler Erythrozyten in den mütterlichen Kreislauf bei Spontangeburt und geburtshilflichen Eingriffen. Geburtsh. u. Frauenheilk. 7, 589 (1962)
53. Zipursky, A., Neelands, P. J., Pollock, J., Chown, B. and Israels, L. G.: The distribution of fetal hemoglobin in the blood of normal children and adults. Pediatrics August 62.
54. Zipursky, A., Pollock, J., Neelands, P., Chown, B. and Israels, L. G.: The transplacental passage

of fetal red blood cells and the pathogenesis
of Rh-Immunisation during pregnancy. Lancet
II, 489 (1963)

H. A N H A N G

Tabellen der Einzelwerte

Tabelle zu Abb. 37 : Beziehung zwischen HbF-Zellen und
quantitativem HbF

Verdünnung (Neugeb.- : Erwachs.blut)	AEM		HbF quantitativ bestimmt
	I-Zellen pro 100 000 Erys	HbF-Zellen pro 100 000 Erys	
1:0	15 050	72 450	66,8 ‰
1:10	2 350	7 600	6,6 ‰
1:100	100	430	0,85 ‰
1:1000	10	90	0,40 ‰
1:10 000	4	8	0,39 ‰
1:100 000	0,4	0,25	0,41 ‰

Vergleich von Ausstrichen, die mit Brillantkresylblau (BKB) vorbehandelt bzw. nicht vorbehandelt worden waren.

Nr.	---	---	BKB + OM	BKB + AEM	BKB (Reti/ 1000 Ery
	OM	AEM			
	(Intermediärzellen/1000 Ery)				1000 Ery
1	44	36	16	28	46
2	19	14	1	4	138
3	33	9	0	7	59
4	19	9	7	7	46
5	19	0	0	0	16
6	25	5	0	6	39
7	42	13	3	12	44
8	22	4	0	1	85
9	0	11	0	0	23
10	99	16	1	5	120
Summe	322	117	28	70	616

Zusammenfassung: OM : (BKB + OM) = 322 : 28

$$= \underline{11 : 1}$$

AEM : (BKB + AEM) = 117 : 70

$$= \underline{1,6 : 1}$$

Tabelle zu Abb. 38 : HbF-haltige Zellen und quantitatives
HbF bei Erwachsenen.

Nr.	I-Z. HbF-Z. pro 2000 Ery	HbF (%)	Nr.	I-Z. HbF-Z. pro 2000 Ery	HbF (%)	Nr.	I-Z. HbF-Z. pro 2000 Ery	HbF (%)
1	0	0,6	18	3	0	35	0	0,4
2	0	0,2	19	0	0	36	1	0,39
3	0	0,1	20	0	0	37	2	0,79
4	0	0,5	21	0	0	38	0	0,46
5	5	0,76	22	0	0	39	0	0,39
6	1	0,1	23	1	0	40	0	0,38
7	1	0,1	24	0	0	41	5	0,56
8	0	0,29	25	1	0	42	10	0,7
9	2	0,73	26 ⁺	25	4	43	11	0,45
10	0	0,4	27	0	0	44	3	0,36
11	0	0,89	28 ⁺⁺	1	0	45	9	0,27
12	0	0,38	29 ⁺⁺	0	0	46	3	0,28
13	0	0,47	30	4	0	47	6	0,35
14	19	0,67	31	0	0	48	0	0,39
15	1	0,47	32	0	0	49	1	0,29
16	2	0,65	33	0	0	50	0	0,26
17	4	0,30	34	4	0	51	0	0,48

+ Bei dieser Person wurde nachträgl. eine Thalassämia minor festgestellt.

++ Diese Werte wurden bei Abb. 38 weggelassen.

Tabelle zu Abb. 39 : HbA-Zellen bei Neugeborenen (0-3 Tg.)

Nr. HbA-Z. /1000 Ery		Nr. HbA-Z. /1000 Ery		Nr. HbA-Z. /1000 Ery	
1	2	22	0	43	45
2	27	23	0	44	10
3	1	24	0	45	51
4	91	25	0	46	5
5	1	26	0	47	3
6	158	27	0	48	75
7	76	28	0	49	22
8	71	29	0	50	4
9	0	30	6	51	75
10	1	31	4	52	17
11	59	32	100	53	0
12	44	33	30	54	9
13	2	34	0	55	2
14	50	35	0	56	24
15	10	36	0	57	0
16	0	37	2	58	75
17	60	38	13	59	29
18	0	39	57	60	67
19	52	40	0	61	9
20	0	41	25	62	0
21	0	42	12		

Tabelle zu Abb. 40 : HbA-Zellen und quantitatives HbF bei
Neugeborenen (0-7 Tg.)

Nr.	HbA-Z.	HbF		Nr.	HbA-Z.	HbF	
		%o	% +15 % [•]			%o	% +15 % [•]
1	2	64,0	73,6	23	10	67,27	77,3
2	27	51,3	59,0	24	0	48,9	56,2
3	1	54,0	62,0	25	60	48,37	55,6
4	83	35,2	41,0	26	0	52,05	60,0
5	91	48,6	56,0	27	52	48,78	56,0
6	1	53,5	61,5	28	0	52,5	60,4
7	1	40,0	46,0	29	0	62,3	71,5
8	158	47,0	54,0	30	0	70,5	81,0
9	76	48,7	56,0	31	0	72,6	83,5
10	75	25,2	29,0	32	0	60,0	69,0
11	71	51,2	59,0	33	0	56,6	64,0
12	0	45,1	52,0	34	0	56,3	63,7
13	10	59,0	68,0	35	0	53,2	61,2
14	71	56,0	64,5	36	0	43,16	49,6
15	16	51,6	59,4	37	0	59,6	68,6
16	1	55,3	63,6	38	6	54,3	62,5
17	4	63,0	72,5	39	4	47,8	55,0
18	59	32,8	37,8	40	100	40,5	46,6
19	180	38,1	43,8	41	30	51,0	58,7
20	44	52,5	60,4	42	0	47,3	54,4
21	2	56,8	65,3	43	2	46,3	53,3
22	50	56,0	64,4				

- Zu den mittels Alkalidenaturierung gewonnenen Ergebnissen wurden (nach BETKE) 15 % des ursprünglichen Wertes dazuaddiert.

Tabelle 6 : HbF bei Frauen nach Entbindung

Nr. HbF-Z. /10000 Ery		Nr. HbF-Z. /10000 Ery		Nr. HbF-Z. /10000 Ery	
1	0	17	2	33	0
2	0	18	0	34	0
3	0	19	0	35	0
4	0	20	0	36	0
5	0	21	2	37	0
6	1	22	3	38	0
7	0	23	0	39	1
8	4	24	0	40	0
9	0	25	0	41	0
10	0	26	0	42	2
11	0	27	4	43	0
12	0	28	0	44	0
13	0	29	0	45	0
14	0	30	2	46	0
15	0	31	0	47	0
16	0	32	0		

LEBENS LAUF

Hannelore Schmidt

Tochter des Vertreters Alfred Schmidt und seiner Ehefrau
Franziska, geb. Minigshofer,

26. Okt. 1947 geboren in Passau.

Sept. 54 bis Juli 58 Besuch der Volksschule in Passau.

Ab Sept. 58 Besuch des humanistischen Gymna-
siums Leopoldinum Passau.

Juli 67 Reifeprüfung am Gymnasium Leopoldinum Passau.

Nov. 67 Immatrikulation als Studentin der
Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München.

April 70 Physikum an der Universität München.

Aug. 71 bis Mai 72 Arbeit an dem experimentellen Teil
meiner Dissertation in der Universitäts-Kinderklinik München unter
Anleitung von Herrn Prof. Dr. Riegel und Herrn Dr. Tor-pong Sanguan-sermsri.

Aug. 73 Staatsexamen an der Universität
München.

Sept. 73 bis März 74 Medizinalassistentin auf der inneren
Abteilung des Städt. Krankenhauses Passau.

Seit März 74 Medizinalassistentin auf der chirurgischen Abteilung des Stadtkrankenhauses Traunstein.

Herzlich danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Riegel und Herrn Prof. Dr. Betke für das Thema dieser Arbeit und für die verständnisvolle Anleitung, ebenso Herrn Dr. Tor-pong Sanguan-sermsri für die vielen Anregungen. Mein Dank gilt auch den Ärzten und Schwestern der Universitäts-Kinderklinik München und der II. Universitäts-Frauenklinik München für die Überlassung der Blutproben.

